

# CAIO ALEXANDRE AUGUSTO RODRIGUES DA SILVA

# DEGRADAÇÃO DE FLUMEQUINA POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

CAMPINAS 2013



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

# CAIO ALEXANDRE AUGUSTO RODRIGUES DA SILVA

# DEGRADAÇÃO DE FLUMEQUINA POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, para obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil, na área de Saneamento e Ambiente.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO CAIO ALEXANDRE AUGUSTO RODRIGUES DA SILVA E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES.

ASSINATURA DO ORIENTADOR:

CAMPINAS 2013

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

Silva, Caio Alexandre Augusto Rodrigues da, 1979-Degradação de flumequina por processos oxidativos avançados / Caio Alexandre Augusto Rodrigues da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.
Orientador: José Roberto Guimarães. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.
1. Fármacos. 2. Processos oxidativos avançados (POA). 3. Atividade antimicrobiana. 4. Subprodutos. 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: Flumequine degradation by advanced oxidation processes Palavras-chave em inglês: Drugs Advanced oxidation process Antimicrobial activity Byproducts Área de concentração: Saneamento e Ambiente Titulação: Doutor em Engenharia Civil Banca examinadora: José Roberto Guimarães [Orientador] Ricardo de Lima Isaac Anne Hélene Fostier Antônio Carlos Silva Costa Teixeira Héctor Daniel Mansilla Gonzalez Data de defesa: 11-07-2013 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Civil

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

# DEGRADAÇÃO DE FLUMEQUINA POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

### Caio Alexandre Augusto Rodrigues da Silva

Tese de Doutorado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. José Roberto Guimarães Presidente e Orientador/ UNICAMP McM & & Free M Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac mu UNICAMP Profa. Dra. Anne Hélene Fostier IQ/Unicamp cento erkenn Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira USP Prof. Dr. Hector Daniel Mansilla Gonzalez Universidad de Concepción

Campinas, 11 de julho de 2013

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, pelo apoio emocional e financeiro, incentivo e pela compreensão dos meus momentos de reclusão.

#### AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Guimarães (Tuca), pela oportunidade do doutorado, orientação dada e apoio durante a realização desta pesquisa, meu eterno agradecimento.

À Dra. Milena Guedes, meu muito obrigado por me aceitar de braços abertos para trabalhar junto ao seu projeto, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência, pelas correções, e principalmente por manter sua porta e agenda sempre abertas para que pudéssemos fazer nossas longas discussões sobre este trabalho. De presente ainda ganhei uma amizade.

À Profa. Susi, agradeço pelo espaço aberto em seu laboratório, para que eu pudesse realizar os meus ensaios, pelo constante incentivo e por todas as demais contribuições que possibilitaram que esse trabalho fosse concluído.

À Dra. Márcia Dezotti agradeço pela doação das cepas de *E. coli* utilizadas nesse trabalho e por toda a ajuda para a implementação do ensaio de atividade antimicrobiana. Meu eterno agradecimento por se recordar de mim quando precisou de um aluno de Pós-Doc para desenvolver um trabalho no Porto (Portugal) e por todo o suporte para que o mesmo se concretizasse.

Aos professores Ricardo Isaac, Anne Fostier, Héctor Mansilla e Antônio Carlos, por terem aceito fazer parte da banca examinadora e pelas valiosas contribuições.

À todos os professores do DSA/FEC/UNICAMP.

À todos os funcionários do DSA/FEC/UNICAMP que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

Aos colegas da pós-graduação da FEC/UNICAMP: Luciana, Regiane, Cristal, Marina, Maiara, Marcela e Mario, por toda ajuda, apoio e conhecimento compartilhado.

À minha amiga Mirthys, por ter tornado as horas de estudo muito mais proveitosas e divertidas.

Aos técnicos do LABSAN: Enelton, Lígia; e um especial obrigado ao Fernando, pela ajuda na implementação do ensaio de atividade antimicrobiana no laboratório de Saneamento da FEC/UNICAMP.

Aos amigos do PED: Fátima, Emídio, Jeffrey, Fernanda e Maria, pelo apoio e pelas conversas de descontração.

Aos colegas do laboratório Paracelsus: Leonardo, Andreza, Martins, Livia e Larissa por estarem sempre predispostos a ajudar, e claro, pela excelente convivência.

À Keity e ao casal Cyntia e Ricardo agradeço pelo treinamento para o uso do HPLC, por toda a paciência e ajuda para resolver os inúmeros problemas que surgiram durante o uso do equipamento. Com certeza, sem a ajuda de vocês, meu trabalho seria mais árduo.

Ao Jonas da FEA e Rita do IC pela ajuda com os ensaios de massa.

À Lisandra, pela gentileza de abrir as portas do seu laboratório, pela constante disponibilidade e pela enorme paciência em chegar mais cedo para que eu pudesse ler as minhas microplacas.

Ao Giovani, da FEAGRI, por ter facilitado, com prontidão, a realização dos ensaios de Microtox.

À Capes pelo apoio financeiro.

À PRPG pelas bolsas de PED-A e PED-B.

Às revistas Journal of Advanced Oxidation Technologies, Chemical Engineering Journal e Science of the Total Environment, por me autorizar a incluir os artigos publicados nesta tese.

Aos meu amigos Vivi, Sihle, João, Fabio, Lucio, Ana, Daniel e Andreia por valorizarem meus estudos, pelos incentivos e pelos momentos de descontração. Amo vocês, obrigado.

Ao meu amigo Rodrigo Marques Elias que sempre me apoiou nas minhas mais loucas ideias, meu "irmão" que nasceu na casa ao lado, mas que já se foi. Saudades e descanse em paz.

Aos meus pais por tudo.

Ao Inácio, por ter dividido o espaço da nossa casa por quase todo o período em que esse trabalho foi desenvolvido, pela paciência com a minha rabugice e com minhas manias.

Ao Roberto, por toda ajuda nas correções dos meus textos em inglês, pela paciência em ouvir minhas lamentações, por me incentivar a seguir meu caminho e pelo apoio.

Por fim, para aqueles que se colocam entre mim e o chão, independente do que aconteça: a minha família. Em especial, obrigado ao Robertinho, Manuellinha, Ina e Douglas, que nesses últimos anos me apoiaram e me sustentaram de todas as formas para que eu pudesse seguir nessa jornada acadêmica.

"The only thing

that will stop you

from fulfilling your dreams

is you".

(Tom Bradley)

### **RESUMO**

Rodrigues-Silva, C. *Degradação de flumequina por processos oxidativos avançados*. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas.

Nesse trabalho foi avaliada a degradação de flumequina (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) por processo físico (fotólise-UV<sub>254</sub>), químico  $(peroxidação-H_2O_2)$ e oxidativos avançados (fotoperoxidação-UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotocatálise heterogênea-UV/TiO<sub>2</sub>, reagente de Fenton-Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foto-Fenton-UV/Fe(II)/H2O2, eletroquímico e foto-eletroquímico) em um reator fotoquímico de recirculação em batelada. Os processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $C_{H2O2 inicial} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1}$ ) e a fotocatálise  $(C_{TiO2 \text{ suspensão}} = 0,62 \text{ mmol } L^{-1})$  foram os processos mais eficientes, reduzindo cerca de 85% da flumequina em 15 min de reação. A fotólise provocou a degradação da flumequina em 91,2% em 60 min de ensaio, enquanto que o processo foto-Fenton 94%, quando usados 10,0 e 0.25 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Fe(II), respectivamente. Por outro lado, a peroxidação  $(C_{H2O2} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1})$  e o reagente de Fenton  $(C_{Fe(II)} = 2,0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ e } C_{H2O2} = 0,5 \text{ mmol } L^{-1})$ não atingiram mais de 10% e 40 % de degradação, respectivamente, após 60 min de reação. Os processos eletroquímico e foto-químico atingiram aproximadamente 82 e 85% de degradação da flumequina, após 60 min de reação quando aplicado 45 mA cm<sup>-2</sup>. A diminuição da atividade antimicrobiana das soluções submetidas aos processos oxidativos avançados foi proporcional à concentração residual da flumequina na solução. Não foi observada atividade antimicrobiana residual nas soluções submetidas aos seguintes processos oxidativos avançados e condições:  $UV/H_2O_2$  ( $C_{H2O2} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1}$ , 30 min de reação),  $UV/TiO_2$  ( $C_{TiO2} = 0.62 \text{ mmol } L^{-1}$ , 30 min de reação), foto-Fenton ( $C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1}$  e  $C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ , 60 min de reação) e foto-eletroquímico (45 mA cm<sup>-2</sup> e 60 min de reação). Os intermediários formados foram monitorados em 10, 15 e 30 min de reação nos processos oxidativos avançados e fotólise, e foi observado que os intermediários propostos possuíam uma atividade antimicrobiana menor que a flumequina. A eficiência dos processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/TiO<sub>2</sub> (1,0 mmol L<sup>-1</sup> e 0,62 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>) foi próximo a 100%, removendo totalmente a atividade antimicrobiana da solução.

Palavras-chave: Fármacos, processos oxidativos avançados (POA), atividade antimicrobiana, subprodutos.

### ABSTRACT

Rodrigues-Silva, C. *Flumequine degradation by advanced oxidation processes*. 2013. Thesis (P.h.D. in Civil Engineering). Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas.

This work evaluated the degradation of flumequine (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) by physical process (photolysis-UV<sub>254</sub>), chemical process (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peroxidation) and advanced oxidation processes (photoperoxidation - UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heterogeneous photocatalysis - UV/TiO<sub>2</sub>, Fenton's reagent - Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, photo-Fenton - UV/Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in a batch-recirculation photochemical The processes  $UV/H_2O_2$  ( $C_{H2O2} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ ) reactor. and photocatalysis  $(C_{TiO2 \text{ suspension}} = 0.62 \text{ mmol } L^{-1})$  are the most efficient ones, reducing about 85% of the flumequine in 15 min of reaction time. The photolysis caused 91.2% of flumequine degradation after 60 min of assay, while the photo-Fenton process degraded 94% of the drug when used 10.0 and 0.25 mmol  $L^{-1}$  of  $H_2O_2$  and Fe(II), respectively. Moreover, peroxidation ( $C_{H2O2} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1}$ ) and Fenton's reagent ( $C_{Fe(II)} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$ ) did not achieve more than 10% and 40% degradation, respectively, after 60 min of reaction. Eletrochemical and photo-eletrochemical processes degraded about 82% and 85%, respectively, after 60 min of reaction at 45 mA cm<sup>-2</sup>. The decrease of the solutions antimicrobial activity subjected to advanced oxidation processes was proportional to the residual concentration of flumequine in the solution. There was no residual antimicrobial activity in the solutions subjected to the following advanced oxidation processes and conditions:  $UV/H_2O_2$  ( $C_{H2O2} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , 30 min of reaction), UV/TiO<sub>2</sub> ( $C_{TiO2} = 0.62$  mmol L<sup>-1</sup>, 30 min of reaction), photo-Fenton  $(C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ , 60 min of reaction) and photo-eletrochemical (45 mA cm<sup>-2</sup>, 60 min of reaction). The intermediates formed were monitored at 10, 15 and 30 min of reaction in photolysis and advanced oxidation processes, where it was observed that the proposed byproducts owned a lower antimicrobial activity than flumequine. The efficiency of the processes  $UV/H_2O_2$  and  $UV/TiO_2$  (1.0 mmol L<sup>-1</sup> and 0.62 mmol L<sup>-1</sup> of  $H_2O_2$  and TiO<sub>2</sub>, respectively) was close to 100%, entirely removing the antimicrobial activity of the solution.

Keywords: Drug, Advanced oxidation Processes (AOP), antimicrobial activity, byproducts.

### LISTA DE FIGURAS

Figuras do Artigo: Degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados

Figura	1.	Principal núcleo das quinolonas	11
Figura	2.	Rota dos antimicrobianos no ambiente	14

Figuras do Artigo: Antibacterial Activity Inhibition after the Degradation of Flumequine by  $UV/H_2O_2$ 

Figure 1. Chemical structure of flumequine. 52 Figure 2. Experimental system used in the degradation studies: 1- magnetic stirrer, 2-reservoir, 3- peristaltic pump and 4- photo-chemical reactor..... 52 Figure 3. Flumequine degradation by photolysis,  $H_2O_2$  and  $UV/H_2O_2$  $(C_{H2O2 initial} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}).$ 53 **Figure 4.** Flumequine degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $C_{H2O2 initial} = 0.5$  to 4.0 mmol L<sup>-1</sup>)..... 54 Figure 5. Absorbance spectra of the flumequine solutions treated by (A) peroxidation, **(B)** photolysis and (C) peroxidation assisted by ultraviolet light  $(C_{H2O2 \text{ initial}} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}).$ 55 Figure 6. Dose-response relationships for flumequine deactivation by (A) peroxidation, (B) photolysis and (C) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $C_{H2O2 \text{ initial}} = 1.0 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$ ).... 56 Figure 7. Correlation between residual flumequine concentration and its antibacterial activity potency in solutions treated by peroxidation, photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>..... 57

**Figuras do Artigo:** Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity

Fig.1. Degradation of flumequine. Fenton: (a)  $C_{Fe(II)} = 0.25$  mmol L<sup>-1</sup> and  $C_{H2O2} = 10.0 \text{ mmol} \text{ L}^{-1}$ , (b)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol} \text{ L}^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol} \text{ L}^{-1}$ , (c)  $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol}$   $L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol} \text{ L}^{-1}$ , and (d)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol} \text{ L}^{-1}$ and  $C_{H2O2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$ . Photo-Fenton: (e)  $C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 10.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (f)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (g)  $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , and (h)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H2O2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$ 62 Fig. 2. Degradation of flumequine by the Fenton process, varying  $C_{H2O2}$  from 0.5 to 10.0 mmol L<sup>-1</sup>. (a)  $C_{Fe(II)} = 0.25$  mmol L<sup>-1</sup>, (b)  $C_{Fe(II)} = 0.5$  mmol L<sup>-1</sup>, and (c)  $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ .... 63 Fig. 3. Degradation of flumequine by the photo-Fenton process, varying  $C_{H2O2}$  from 1.0 to 10.0 mmol L<sup>-1</sup>. (a)  $C_{Fe(II)} = 0.25$  mmol L<sup>-1</sup>, (b)  $C_{Fe(II)} = 0.5$  mmol L<sup>-1</sup>, and (c)  $C_{\text{Fe(II)}} = 1.0 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$ . 64 Fig. 4. Absorbance spectra of flumequine solutions degraded by (a) the Fenton process  $(C_{H2O2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1})$ , and (b) the photo-Fenton process  $(C_{H2O2} = 10.0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1})$ ..... 64 Fig. 5. Dose-response curves for flumequine degradation by the Fenton process: (a)

$C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{H2O2} = 10.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (b) $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and}$	
$C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (c) $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ and $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , and	
(d) $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{mmol } L^{-1}$ and $C_{H2O2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$	65
Fig. 6. Dose–response curves for flumequine degradation by the photo-Fenton process:	
(a) $C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1}$ and $C_{H2O2} = 10.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (b) $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$ and	
$C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (c) $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ and $C_{H2O2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , and	
(d) $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{H2O2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$	66
Fig. 7. Luminescence inhibition assay with Vibrio fischeri	66
Fig. 8. Proposed flumequine oxidation byproducts formed by the Fenton and	
photo-Fenton processes	67

Figuras do Artigo: Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity

Fig. 1. Flumequine degradation by UV and UV/TiO <sub>2</sub> . TiO <sub>2</sub> concentrations vary from	
0.08 to $1.88$ mmol L <sup>-1</sup>	73
Fig. 2. Flumequine degradation by $UV/H_2O_2$ , $UV/TiO_2$ and $UV/TiO_2/H_2O_2$	
$(0.5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ H}_2 \text{ O}_2)$	74
<b>Fig. 3</b> . Dose–response curves for flumequine degradation by (A) $UV/TiO_2$	
$(0.16 \text{ mmol } L^{-1} \text{ TiO}_2)$ , and (B) UV/TiO <sub>2</sub> $(0.16 - 1.88 \text{ mmol } L^{-1} \text{ TiO}_2)$ and	
$UV/TiO_2/H_2O_2$ (0.31 mmol L <sup>-1</sup> TiO <sub>2</sub> and 0.50 mmol L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in 15 min reactions	76

**Figuras do Artigo:** Avaliação da atividade antimicrobiana residual em soluções de fluemquina submetidas aos processos eletroquímico e foto-eletroquímico

**Figura 1.** Sistema operacional do reator foto-eletroquímico: 1 - Tubo de guatzo; 2 – Catodo; 3 – Anodo; 4 - Reservatório de 1,2 L; 5 – Bomba peristáltica..... 86 Figura 2. Degradação de flumequina por fotólise (11 e 80 W) e fotocatálise heterogênea com TiO<sub>2</sub> imobilizado..... 88 Figura 3. Degradação de flumequina pelo processo eletroquímico e foto-eletroquímico empregando K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte..... 89 Figura 4. Degradação de flumequina por eletroquímico (A) e foto-eletroquímico (B), empregando 0,025 mol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte, UV<sub>254</sub> 11W e variando a densidade da corrente entre 0 e  $45 \text{ mA cm}^{-2}$ . 89 Figura 5. Espectro de massa das soluções submetidas à degradação pelo processo eletroquímico (30 mA cm<sup>-2</sup>) nos tempos de degradação: (D) t = 15 min, (C) t = 30 min, 91 (B)  $t = 45 \min e (A) t = 60 \min$ . Figura 6. Espectro de massa das soluções submetidas à degradação pelo processo eletroquímico (UV<sub>254</sub> = 11W e 30 mA cm<sup>-2</sup>) nos tempos de degradação: (D) t = 15 min. (C) t = 30 min, (B) t = 45 min e (A) t = 60 min.... 91 Figura 7. Avaliação da atividade antimicrobiana residual após degradação das soluções de flumequina pelo processo eletroquímico (A, B, C) e pelo processo foto-eletroquímico (D, E, F). Densidade da corrente de 15 a 45 mA cm<sup>-2</sup> e 0,025 mol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (eletrólito suporte)..... 94

### Figuras dos Apêndices

Figura A1.1: Curva analítica da flumequina	116
Figura A2.1 Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
$UV/H_2O_2$ (C <sub>H2O2</sub> = 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) e estrutura molecular dos intermediários propostos	122
Figura A2.2 Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
$UV/H_2O_2$ ( $C_{H2O2} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1}$ ) e estrutura molecular dos intermediários propostos	123
Figura A2.3: Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
$UV/H_2O_2$ ( $C_{H2O2} = 0.5$ mmol L <sup>-1</sup> ) e estrutura molecular dos intermediários propostos	124
Figura A2.4: Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
Fenton ( $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ e } C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ )	125
Figura A2.5: Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
Fenton ( $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} e C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ ) e estrutura molecular dos	
intermediários propostos	126
Figura A2.6: Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo	
foto-Fenton ( $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} e C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ )	126

## LISTA DE TABELAS

# Tabela do Artigo: Degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados

<b>Tabela 1:</b> Classificação das quinolonas segundo seu espectro de ação antimicrobiana	12
Tabela 2: Ocorrência das quinolonas em matrizes aquosas	15
Tabela 3: Ocorrência das quinolonas em matrizes sólidas	17
Tabela 4: Aplicação de processos convencionais para a degradação de quinolonas em	
matrizes aquosas	24
<b>Tabela 5:</b> Aplicação de processos oxidativos avançados para a degradação de quinolonas	27
em matrizes aquosas	21
Tabela do Artigo: Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity	
Table 1: Flumequine and proposed byproducts	75
Tabelas dos Apêndices	
Tabela A1.1: Parâmetros da metodologia analítica utilizada	117
Tabela A1.2: Avaliação da recuperação do analito pelos cartuchos de extração	118
Tabela A1.3: Avaliação do pH de extração	119

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHI: Animal Health Institute

BC: banda de condução

BV: banda de valência

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva para causar dano a 50% da população de organismos expostos a um agente tóxico

COT: carbono orgânico total

DAD: detector de arranjo de fotodiodos

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

DNA: ácido desoxirribonucleico

DQO: demanda química de oxigênio

DSA®: ânodo dimensionalmente estável

E: potencial de oxidação

ETA: estação de tratamento de água

ETE: estação de tratamento de esgoto

FEC: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe(II): reagente de Fenton

HPLC: cromatografia à líquido de alta eficiência (high performance liquide chromatography)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LOD: limit of detection (limite de detecção)

LOQ: limit of quantification (limite de quantificação)

PEQ: potency equivalent values (potência equivalente)

pH: potencial hidrogeniônico

POA: processos oxidativos avançados (advanced oxidation processes)

SPE: solid phase extration (extração em fase sólida)

UFC: Unidades formadoras de colônia (colony-forming unit)

UV: ultravioleta

UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxidação assistida por radiação ultravioleta (peroxidation assisted by ultraviolet light)

UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe(II): foto-Fenton

UV/TiO<sub>2</sub>: fotocatálise com TiO<sub>2</sub> em suspensão WHO: World Health Organization

# SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	XV
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral	5
2.2 Objetivos específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4 Resultados e Discussões	49
4.1 Degradação de flumequina por UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	49
4.2 Degradação de flumequina por Fenton e foto-Fenton	59
4.3 Degradação de flumequina por UV/TiO <sub>2</sub>	70
4.3.1 Material suplementar	78
4.4 Degradação de flumequina pelos processos eletroquímico e foto-eletroquímico	82
5. CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
APÊNDICES	113
APÊNDICE 1 – Metodologia analítica	115
A1.1 – Cromatografia	115
A1.2 - Extração em fase sólida (SPE)	118
APÊNDICE 2 – Espectros de massa	121
A2.1 - Processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	122
A2.2 – Fenton e foto-Fenton	125

## 1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são utilizados na medicina humana e animal para o tratamento e/ou prevenção de doenças causadas por bactérias. Na pecuária, eles têm sido utilizados como promotores de crescimento, sendo administrados aos animais em doses mais baixas (200 g por ton de alimento por um período superior a 14 dias) do que de em terapia comum (Graham *et al.*, 2007). Uma vez administrados aos animais, a maioria desses fármacos não é totalmente metabolizada, sendo excretados *in natura* nas fezes e/ou urina na sua forma não metabolizada ou por meio de seus metabólitos ativos (Jjemba, 2006). Uma vez dispersos no ambiente, a biota fica exposta aos antimicrobianos, podendo contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes.

Pouco se sabe sobre o destino e efeitos dos fármacos veterinários no meio ambiente. No Brasil, onde existe uma legislação omissa em relação ao monitoramento da produção, destino e aplicação de antimicrobianos, não é possível desenhar, com maior precisão, a dispersão e o impacto desses fármacos no ambiente. Sabe-se apenas que o mercado brasileiro alvo para o emprego de antimicrobianos para fins terapêuticos, prevenção de doenças e como promotores de crescimento é de 1,6 bilhão de animais (IBGE, 2011).

Dentre os antimicrobianos comumente usados na medicina veterinária destacam-se as quinolonas, que atuam no DNA-girase da célula da bactéria inibindo sua duplicação. A flumequina, da segunda geração das quinolonas, também referenciadas como fluoroquinolonas, é ativa contra organismos gram negativos e positivos. As quinolonas já foram detectadas em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto na ordem de  $\mu$ g L<sup>-1</sup> a ng L<sup>-1</sup> (Xiao *et al.*, 2008). A flumequina, por exemplo, já foi detectada no Rio Sena na faixa de ng L<sup>-1</sup> (Tamtam *et al.*, 2008). Dessa forma, pode-se concluir o quão grande é o potencial de dispersão das quinolonas no ambiente. Além disso, apesar da concentração de flumequina detectada no ambiente ser, aproximadamente, 300 vezes menor que a concentração mínima para inibir o crescimento de 50% da população da cultura da bactéria *Escherichia coli* (EC<sub>50</sub>), seu impacto pode ser acentuado com o efeito aditivo da presença de outras quinolonas no efluente.

As estações de tratamento de água (ETA) e esgoto (ETE) não são projetadas para remover antimicrobianos, como flumequina, visto que as etapas de purificação da água se resumem, principalmente, a processos físicos-químicos, não promovendo a oxidação de poluentes orgânicos solúveis presentes no efluente (Backhaus *et al.*, 2000; Hernando *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2007; Batt *et al.*, 2007; Lin *et al.* 2009; Gao *et al.*, 2012; Lai e Lin, 2009). É importante salientar que, mesmo quando os estudos reportam a redução da concentração do antimicrobiano em um efluente tratado, observa-se que o lodo da ETA apresenta elevadas concentrações do fármaco monitorado, podendo chegar até 1000 vezes mais concentrado do que no efluente de entrada da estação (Lai e Lin, 2009).

Diversos estudos têm reportado a degradação de fármacos veterinários, inclusive flumequina, por processos oxidativos avançados (POA) (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011; Homem e Santos, 2011; Michael *et al.*, 2013). Os POA são predominantemente caracterizados pela geração do radical hidroxila ('OH), que possui elevado potencial de redução (E = 2,8 V). Os radicais hidroxila, gerados nos POA, podem reagir com uma variedade de compostos orgânicos recalcitrantes, oxidando-os a moléculas intermediarias mais simples, ou até mesmo levando à sua completa mineralização.

Dentre os POA, a peroxidação assistida por luz ultravioleta, ozonização, reagente de Fenton, foto-Fenton e fotocatálise são os processos mais comumente empregados no tratamento de soluções contaminadas por antimicrobianos (Homem e Santos, 2011). Os POA podem ser considerados portanto como uma alternativa para o tratamento de efluentes contaminados por antimicrobianos, ou mesmo como um tratamento terciário, visando o refinamento da qualidade final da água tratada.

Não basta apenas avaliar a degradação do antimicrobiano alvo para comprovar a eficácia de um POA, pois, durante o processo de degradação, podem ser formados intermediários com atividade biológica igual ou superior ao composto original (Klamerth *et al.*, 2010). Dessa forma, torna-se importante o monitoramento da atividade antimicrobiana da solução, assim como, estudos dos intermediários de degradação. É importante salientar que mesmo que o antimicrobiano alvo estudado não possa ser mais detectado no efluente após ser submetido a um

POA, a completa eficiência do processo somente será comprovada caso a atividade antimicrobiana tenha sido igualmente removida da solução.

Este é o primeiro trabalho dedicado à avaliação da atividade antimicrobiana residual, de forma quantitativa, em soluções de flumequina submetidas à degradação pelos processos peroxidação, fotólise, peroxidação assistida por luz ultravioleta, Fenton, foto-Fenton, fotocatálise, eletroquímico e foto-eletroquímico.

A presente tese foi confeccionada em modo alternativo e atende a resolução CPPG-EC/FEC-062/2013, sendo organizada da seguinte forma: 1 – resumo em português e inglês; 2 - um capítulo de introdução; 3 - um capítulo de objetivos; 4 - revisão bibliográfica no formato de artigo científico a ser submetido para revista; 5 - metodologia e resultados apresentados na forma de três artigos científicos, já publicados, e um artigo a ser submetido para publicação; 6 - um capítulo de conclusão; 7 - referências bibliográficas; 8 - dois apêndices em português.

### **2 OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a degradação de flumequina em solução aquosa pelos processos oxidativos avançados:  $UV/H_2O_2$  (peroxidação assistida por radiação ultravioleta, reagente de Fenton ( $H_2O_2/Fe(II)$ ), foto-Fenton ( $UV/H_2O_2/Fe(II)$ ), fotocatálise com TiO<sub>2</sub> em suspensão ( $UV/TiO_2$  e  $UV/TiO_2/H_2O_2$ ), eletroquímico e foto-eletroquímico.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Consolidar um método analítico para a determinação de flumequina em matrizes aquosas, usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada a um detector UV;
- ✓ Avaliar a eficácia dos processos de degradação (fotólise (UV), peroxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Fenton, foto-Fenton, UV/TiO<sub>2</sub>, eletroquímico e foto-eletroquímico) na remoção da flumequina em solução aquosa;
- Avaliar a remoção da atividade antimicrobiana das soluções de flumequina submetidas aos processos de degradação;
- Investigar e propor a estrutura química dos intermediários formados durante a degradação da flumequina por processos oxidativos avançados.

# 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica será apresentada na forma de artigo científico "Degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados", o qual será submetido à revista Química Nova. Este artigo corresponde as páginas 8 a 47 desta tese.

# DEGRADAÇÃO DE QUINOLONAS POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

### Caio Rodrigues-Silva, Milena Guedes Maniero, Marcela Souza Peres,

### José Roberto Guimarães<sup>\*</sup>

Departamento de Saneamento e Ambiente, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas – Avenida Albert Einstein, 951 – Caixa Postal 6021 – 13083-852 – Campinas (SP), Brasil. – Tel.: (19) 3521-2378 – Fax: (19) 3521-2411 – \*e-mail: jorober@fec.unicamp.br

#### DEGRADATION OF QUINOLONES BY ADVANCED OXIDATION PROCESSES

In this review, studies on the occurrence of quinolones were analyzed. Their presence in the environment matrices raises concerns about the risk of resistant bacteria development. They are mainly detected in surface waters and effluents from sewage treatment plants. Conventional methods of treating water and wastewater are not completely effective for degradation of quinolones. The AOPs (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton, photo-Fenton, UV/TiO<sub>2</sub>) and ozonation were efficient for degradation of these emerging contaminants. The main routes of degradation of these drugs by hydroxyl radicals as well as toxicity and antimicrobial activity data of solutions submitted to degradation processes are presented.

Keywords: antimicrobials, occurrence, toxicity.

### 1. INTRODUÇÃO

Antimicrobianos são definidos como compostos naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, cuja finalidade é prevenir ou tratar doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos,<sup>1</sup> tanto nos seres humanos como na medicina veterinária. Visto que não são totalmente metabolizados durante o uso terapêutico, os antimicrobianos estão presentes no esgoto domiciliar principalmente como resultado da excreção humana. O uso de antimicrobianos na atividade pecuária contribui, também, para a sua introdução no meio ambiente, como resultado de processos de manufatura, disposição irregular ou excreção metabólica.<sup>2</sup> Dessa forma, esses compostos são continuamente lançados no ambiente e, considerando sua característica recalcitrante, de difícil remoção e degradação, sendo essa classe de compostos considerada pseudo-persistente.

Existem aproximadamente onze classes diferentes de antimicrobianos,<sup>3</sup> que se diferenciam por sua estrutura química ou mecanismos de ação no tratamento específico de determinado patógeno. As quinolonas, antimicrobianos sintéticos, são eficientes no tratamento de infecções por micro-organismos e por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e são largamente empregadas tanto na medicina humana como veterinária. Bactérias Gram-negativas são aquelas que possuem mais de uma camada de parede celular como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* (causadora de infecções no aparelho pulmonar, urinário e respiratório), *Escherichia coli* (causadora de infecções urinárias) e *Salmonella* (causadora de intoxicação alimentar). Bactérias Gram-positivas são aquelas que possuem apenas uma camada de parede celular como, por exemplo, a *Streptococcus pneumoniae*.<sup>4,5</sup>

Dentre os principais riscos para o meio ambiente da presença de quinolonas destacam-se a preocupação com o desenvolvimento de bactérias resistentes, a possibilidade desses poluentes emergentes em afetar o sistema endócrino, e inclusive, por oferecem riscos para espécies não-

alvo, seja por sua toxicidade e/ou por possíveis efeitos ecotoxicológicos ainda pouco conhecidos.<sup>6-10</sup>

As estações de tratamento de água e esgoto, que foram desenvolvidas no início do século XX, estão prestes a enfrentar uma variedade de desafios. Pesquisas científicas tem reportado a habilidade dessas estações de tratamento em apenas reduzir a concentração de compostos farmacêuticos, sem necessariamente removê-los.<sup>9</sup> Além disso, os índices de remoção da concentração de fármacos do afluente da ETE não indicam, necessariamente, a degradação dos mesmos, uma vez que o lodo da ETE pode apresentar elevada concentração desses poluentes.<sup>10-12</sup>

Os processos oxidativos avançados (POA) tem sido apontados como uma alternativa de solução para o tratamento de efluentes contaminados por fármacos, inclusive os pertencentes à classe das quinolonas. Os POA são baseados na formação do radical hidroxila ('OH), um forte oxidante não seletivo com a capacidade de mineralizar compostos orgânicos, devido ao seu elevado potencial de redução.<sup>12-13</sup>

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência e rotas de contaminação das quinolonas em matrizes aquosas e solo, fazer uma revisão na literatura dos trabalhos que investigam a degradação desses compostos por processos oxidativos avançados e discutir a atividade antimicrobiana, toxicidade e produtos de degradação das soluções submetidas à tratamento.

#### 2. QUINOLONAS

A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi sintetizada em 1962 a partir da cloroquina (um fármaco destinado ao tratamento da malária).<sup>4-5</sup> Desde então, subsequentes alterações no núcleo da quinolona, por meio da adição de diferentes substituintes nas posições N-1, C-6, C-7 e C-8 (Figura 1), deram origem aos demais agentes antimicrobianos dessa classe de compostos.<sup>6</sup> A adição de selecionados substituintes nos ligantes-chave da estrutura principal da quinolona viabilizou o desenvolvimento de antimicrobianos que fossem mais potentes e capazes de agir contra um maior grupo de micro-organismos.



Figura 1. Principal núcleo das quinolonas.

Uma das principais mudanças na estrutura das quinolonas foi a adição do íon fluoreto na posição C-6, que ampliou o espectro de ação das quinolonas para as bactérias Gram-positivas. A adição de um segundo fluoreto na posição C-8 resultou no aumento da absorção e aumento da meia-vida da quinolona no organismo humano; no entanto, aumentou a fototoxicidade do composto. A adição de um grupo piperazina na posição C-7 ampliou a ação contra as bactérias aeróbias Gram-negativas. Porém, uma vez adicionado um grupo metila ao nitrogênio da piperazina, observou-se um aumento do tempo de meia-vida no organismo e da biodisponibilidade. Um aumento da ação contra bactérias aeróbias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas foi observado com a adição de um grupo ciclopropil na posição N-1.<sup>4</sup>

Não é totalmente claro na literatura como as quinolonas são classificadas com relação às gerações, uma vez que cada autor emprega um método diferente. A única divisão aceita universalmente é a separação entre compostos com flúor (também denominadas como fluoroquinolonas) das quinolonas de primeira geração, que não possuem flúor em sua composição. King *et al.*,<sup>7</sup> Ball,<sup>8</sup> Xiao *et al.*,<sup>9</sup> e Bolon<sup>5</sup> relacionam as quinolonas com o seu espectro de abrangência contra micro-organismos patogênicos, classificando esses antimicrobianos em quatro gerações diferentes, apresentados na Tabela 1.


	• 1 1	· 1 ~ · · 1 ·
<b>I ahela I</b> (Tassificacao das c	uunalanas segunda seu est	sectro de acao antimicrobiana
Tabela I. Classificação das c	amoionas segundo seu esp	

Tabela 1. Continuação

	4ª Geração: Acrescentou a cobertura contra organismos anaeróbios.					
Sitafloxacina	Trovafloxacina	Prulifloxacina	Enrofloxacina			
			P N N N N N N N N N N N N N N N N N N N			
410 g mol <sup>-1</sup>	416 g mol <sup>-1</sup>	461 g mol <sup>-1</sup>	359 g mol <sup>-1</sup>			

# **3. OCORRÊNCIA**

A porcentagem de um antimicrobiano excretado por um animal, em sua forma não metabolizada, depende de diversos fatores, entre os quais, a substância aplicada, a dosagem, a espécie e a idade do animal.<sup>1</sup> Segundo Regitano e Leal,<sup>10</sup> as fluoroquinolonas apresentam uma taxa de metabolização maior que 20%, sendo classificadas como de moderada metabolização. Dessa forma, uma vez administradas aos animais, as quinolonas podem ser excretadas *in natura* por meio das fezes e/ou urina. Ressalta-se ainda que as fluoroquinolonas não sofrem alterações em sua estrutura química na ausência de luz, sob aeração, variação de temperatura  $(10 - 55 \ ^{\circ}C)$ ,<sup>1,11</sup> ou mesmo durante o processo de compostagem, podendo dispersar-se no meio ambiente em sua forma inalterada.

Essa classe de fármacos não é degradada ou completamente removida nas estações convencionais de tratamento de água e esgoto,<sup>12-14</sup> limitando as possibilidades de sua eliminação. Efluentes com traços de antimicrobianos podem atingir corpos receptores, como rios, lagos e estuários e, inclusive, lençois freáticos e águas destinadas ao abastecimento público.

Excreção humana e animal, descargas de aquiculturas, descarte da indústria farmacêutica, disposição dos resíduos domésticos e hospitalares, que contenham, inclusive, produtos vencidos e/ou não aplicados são responsáveis pela dispersão de fármacos no ambiente (Figura 2).<sup>1,15-17</sup> Dentre esses, a excreção animal e a aplicação de fármacos na aquicultura são os meios majoritários de disseminação das quinolonas no meio ambiente aquático.



*Figura 2*. Rota dos antimicrobianos no ambiente (adaptada de Kemper<sup>1</sup>)

Não existem dados e informações disponíveis na literatura sobre o volume de produção de medicamentos, inclusive antimicrobianos, voltados à medicina humana e veterinária no Brasil e pouco se conhece sobre o destino e efeitos desses compostos no meio ambiente. No Brasil, sabe-se apenas que a produção de medicamentos destinados à medicina humana e veterinária movimentou cerca de R\$ 22,1 bilhões em 2010, sendo R\$ 1,3 bilhão referente à produção e venda de antimicrobianos destinados ao consumo humano e R\$ 1,5 bilhão ao uso veterinário.<sup>18</sup> Nos Estados Unidos, o Animal Health Institute (AHI) apresentou uma estimativa onde apontou que em 2008 dos 12 milhões de quilos de antimicrobianos produzidos, 30% seriam empregados para fins terapêuticos e que 13% seriam empregados como promotores de crescimento.<sup>19</sup>

Pesquisas sobre o monitoramento de quinolonas em águas superficiais são escassas na literatura especializada. Dos trabalhos publicados sobre a ocorrência e identificação de tais compostos no ambiente, apenas algumas das quinolonas existentes (Tabela 1) são foco dos estudos, conforme Tabelas 2 e 3. As principais pesquisas sobre a ocorrência de quinolonas em matrizes aquosas (água superficial, água para abastecimento público, afluente e efluente de estações de tratamento de esgoto, efluente hospitalar e efluente pecuário) foram realizadas na Europa (França, Espanha, Áustria, Holanda, Suíça, Grécia, Itália e Suécia), Ásia (China, Vietnã e Taiwan) e Estados Unidos (Tabela 2). A concentração das quinolonas variou entre ng L<sup>-1</sup> e  $\mu$ g L<sup>-1</sup> em matrizes aquosas, <sup>9,20-44</sup> e em solo, variou entre ng g<sup>-1</sup> a  $\mu$ g g<sup>-1</sup> (Tabela 3).<sup>26,28,45-47</sup>

Tabela 2. Ocorrência das quinolonas em matrizes aquosas

Quinolona	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Matriz	Região	Referência
	<10	Água superficial	França/Paris	20
	14	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
Ácido	200-500	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
nalidíxico	40-200	Efluente de ETE	Taiwan	23
Quinolona         Ácido         nalidíxico         Ácido oxolínico         Ácido pipemídico         Ácido piromídico         Ciprofloxacina	450	Efluente de ETE	Austrália/Brisbane	24
Quinolona         Concentração (ng L')         Matriz         Reg ácido           <10	Espanha/Castellon-Valencia	21		
	10-19	Água superficial	França/Paris	20
Ácido	23	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
oxolínico	<5	Água para abastecimento público (clorada)	EUA/Carolina do Norte	25
Quinolona         Ácido         nalidíxico         Ácido oxolínico         Ácido pipemídico         Ácido piromídico         Óciprofloxacina	300-600	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	6,5-13	Água superficial	China/Pequim	9
	245	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
á · 1 · / 1	86	Afluente de ETE	China/Pequim	26
Acido pipemidico	200-1500	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	12	Efluente de ETE	China/Pequim	9
	430	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
Ácido piromídico	200-1100	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	7-9	Água subterrânea de região pecuária	China	27
	31,8-42,5	Água subterrânea de região pecuária	China	28
	<10	Água superficial	França	20
	7,1-20	Água superficial	China	9
	9.660	Água superficial	França/Rio Arc	29
	5-116	Água superficial	EUA /Arkansas	30
	740	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
	60,3	Água superficial	China/Baiyangdian	31
	2,0-8,2	Água para abastecimento público (clorada)	China/Macao	32
	6,0-679,7	Água para abastecimento público (clorada)	China/Guangzhou	32
	99	Afluente de ETE	China/Pequim	26
	1.100	Afluente de ETE	Austrália	24
G: <b>G</b> :	39-458	Afluente de ETE	China/Chongqing	33
Ciprofioxacina	30	Amostra de ETE	EUA	34
	200-2.000	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	780	Efluente de ETE	Espanha/Madrid	35
	45-400	Efluente de ETE	Suíça	36
	30-70	Efluente de ETE	França, Grécia, Itália e Suécia	37
	<19	Efluente de ETE	EUA	38
	310	Efluente de ETE	EUA	39
	220-450	Efluente de ETE	EUA	40
	27	Efluente de ETE	China	9
	780	Efluente de ETE	Espanha/Madrid	35
	2292	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	850-2.000	Efluente hospitalar	EUA/Novo México	41
	1.100-44.000	Efluente hospitalar	Vietnã/Hanói	42

T	<b>`abela</b>	2.	continu	ação

Quinolona	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Matriz	Região	Referência
c: d :	15.000	Efluente hospitalar	Austrália	24
Ciprofloxacina	20-300	Efluente pecuário	China	27
Enserving	11	Água superficial	França	20
Enoxacina	100-1.200	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	70	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
	4,42	Água superficial	China/Baiyangdian	31
	2,8-5,2	Água para abastecimento público (clorada)	China/Macao	32
	8,3	Água para abastecimento público (clorada)	China/Guangzhou	32
Enrofloxacina	8,3	Afluente de ETE	China/Pequim	26
Emonoxuoniu	270	Efluente de ETE	EUA	39
	10-30	Efluente de ETE	França, Grécia, Itália e Suécia	37
	50	Efluente de ETE	Austrália	24
	220	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	100	Efluente hospitalar	Austrália	24
	6,35	Agua superficial	China/Baiyangdian	31
Fleroxacina	14	Afluente de ETE	China/Pequim	26
	5,8	Efluente de ETE	China	9
	13-29	Agua superficial	França/Paris	20
F1 .	20	Agua superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
Flumequina	12,3-25,9	Agua superficial	China/Henan	43
	2,0-2,5	ETA (Clorada)	EUA/Carolina do Norte	25
	41		Espanna/Castellon-Valencia	21
Catiflanasias	16-41	Agua superficial	China (De avrine	9
Gannoxacina	56	Efluente de ETE	China	26
	30		China	9
	8.0.27.1	Água superniciai	China/Magao	32
	0,9-37,1	Água para abastecimento público (clorada)	China/Macao China/Guangzhou	32
T G .	1/3	Agua para abastecimento publico (ciorada)	China/Guangzilou	32
Lomefloxacina	143	Afluente de ETE	China/Pequim	26
	<41	Efluente de ETE	FUA	38
	130-320	Efluente de ETE	França Grécia Itália e Suécia	37
	17	Efluente de ETE	China	9
	7 2-14	Água superficial	China	9
	205	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
	72	Afluente de ETE	China/Pequim	26
Moxifloxacina	200-2.500	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
	17	Efluente de ETE	China	9
	540	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	2	Água subterrânea de região pecuária	China	27
	13-163	Água superficial	França	20
	19-66	Água superficial	China	9
	54	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
	156	Água superficial	China/Baiyangdian	31
	7,0-17,1	Água para abastecimento público (clorada)	China/Macao	32
	82,7	Água para abastecimento público (clorada)	China/Guangzhou	32
	775	Afluente de ETE	China/Pequim	26
	859	Afluente de ETE	China/Chongqing	33
	120	Amostra de ETE	EUA	34
Norfloxacina	200-1.600	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
Normoxaema	49-367	Efluente de ETE	Suíça	36
	30-80	Efluente de ETE	França, Grécia, Itália e Suécia	37
	<45	Efluente de ETE	EUA	38
	330	Efluente de ETE	EUA	39
	85-320	Etluente de ETE	China/Hong Kong	44
	85	Efluente de ETE	China	9
	250	Efluente de ETE	Austrália	24
	310	Etluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	900-17.000	Efluente hospitalar	Vietnã/Hanói	42
	200	Efluente hospitalar	Austrália	24
	10-200	Efluente pecuário	China	27
Ofloxacina	2-2,5	Agua subterranea de região pecuária	China	2/
	10-55	Agua superficial	Franca	20

### Tabela 2. continuação

Quinolona	Concentração (ng L <sup>-1</sup> )	Matriz	Região	Referência
	149-535	Água superficial	China	9
	17-182	Água superficial	EUA/Arkansas	30
	74	Água superficial	China/Chongqing	33
	400	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
	32,6	Água superficial	China/Baiyangdian	31
	1.287	Afluente de ETE	China/Pequim	26
	200-1.700	Amostra de ETE	Espanha/Granada	22
Offerening	1800	Efluente de ETE	Espanha /Madri	35
Onoxacina	100-204	Efluente de ETE	EUA	38
	110	Efluente de ETE	EUA/Novo México	41
	503	Efluente de ETE	China	9
	53-991	Efluente de ETE	Taiwan	23
	120-580	Efluente de ETE	França, Grécia, Itália e Suécia	37
	925	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	25.500-35.500	Efluente hospitalar	EUA/Novo México	41
	100-5.000	Efluente pecuário	China	27
D-flama aina	64	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
Perioxacina	112	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
	55	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	21
Saraflavasina	28,2	Água superficial	China/Baiyangdian	31
Pefloxacina Sarafloxacina	250	Efluente de ETE	EUA	39
	52	Efluente de ETE	Espanha/Castellon-Valencia	21
Sparfloxacina	4,4	Afluente de ETE	China/Pequim	26

Tabela 3. Ocorrência das quinolonas em matrizes sólidas.

Quinolona	Concentração (ng g <sup>-1</sup> )	Matriz	Região	Referência
Ácido nalidíxico	1,1-22,1	Solo/irrigado com esgoto	França	45
Ácido oxolínico	1,2-4,8	Solo/irrigado com esgoto	França	45
Ácido pipemídico	270	Lodo de ETE	China/Pequim	26
	0,8-30,1	Solo	China	28
Ciprofloxacina	2,4-641,6	Solo	China/Shandong	46
Enroflovacina	1.040	Lodo de ETE	China/Pequim	26
	50	Solo de área agrícola	Turquia/Istambul	47
Enrofloxacina	0,1-166,9	Solo	China/Shandong	46
	70	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Fleroxacina	80	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Flumequina	2,2-6,9	Solo/irrigado com esgoto	França	45
Gatifloxacina	490	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Lomefloxacina	1.000	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Moxifloxacina	530	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Nerflerreine	0,4-288,3	Solo	China/Shandong	46
Normoxacina	7.230	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Offerening	0,6-1,6	Solo	China	28
Onoxacina	7.790	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Sarafloxacina	530	Lodo de ETE	China/Pequim	26
Sparfloxacina	40	Lodo de ETE	China/Pequim	26

Das 15 quinolonas detectadas em águas superficiais e em estações de tratamento de esgoto, 13 delas (ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacina, fleroxacina, flumequina, gatifloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina e sarafloxacina) foram identificadas em ambas matrizes na

faixa de 1,3 a 9660 ng L<sup>-1</sup>. A elevada concentração desses compostos nessas matrizes pode estar relacionada ao intenso uso na medicina humana ou animal.

Em águas superficiais, ácido pipemídico, ciprofloxacina e ofloxacina foram detectados em concentrações superiores a 245 ng L<sup>-1</sup>. Destaca-se ainda que a gatifloxacina, uma das quinolonas desenvolvida mais recentemente, foi detectada na China, tanto no esgoto como em águas superficiais, na faixa de 16 - 66 ng L<sup>-1</sup>.

Ofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina foram detectadas em concentrações bastante elevadas em efluente hospitalar (35,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de ofloxacina, 44  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de ciprofloxacina e 17  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de norfloxacina)<sup>41-42</sup>. As concentrações elevadas desses compostos nesse tipo de efluente, quando comparadas às concentrações encontradas nas outras matrizes aquosas (Tabela 2), podem indicar seu extenso uso em humanos para fins terapêuticos. Duong *et al.*<sup>42</sup> relataram que colônias de *E. coli* que foram expostas a um efluente hospitalar contendo ciprofloxacina e norfloxacina tiveram sua população reduzida em duas escalas de grandeza; além disso, destacaram que foram identificadas bactérias resistentes a essas fluoroquinolonas. Ressalta-se também que a concentração de ofloxacina encontrada por Brown *et al.*<sup>41</sup> no efluente hospitalar foi 2,6 vezes maior do que a concentração de ofloxacina necessária para causar efeito em 50% das bactérias *Vibrio fischeri* (ensaio Microtox) (CE<sub>50,24h</sub>).<sup>48</sup>

Tamtam *et al.*<sup>20</sup> constataram a presença de 17 antimicrobianos no rio Sena, entre as cidades francesas de Paris e Le Havre; a flumequina foi detectada na faixa de 13 a 29 ng L<sup>-1</sup>. Apesar da concentração reportada por Tamtam *et al.*<sup>48</sup> ter sido aproximadamente 1.450 vezes menor do que a concentração necessária para causar efeito em 50% dos organismos ( $CE_{50,24h}$ ) nos ensaios com *Vibrio fischeri* (19 µg L<sup>-1</sup>),<sup>48</sup> a toxicidade nesse meio pode ser intensificada pela presença de outras quinolonas, que apresentam o mesmo mecanismo de ação (inibição do DNA<sub>girase</sub> da bactéria).<sup>48</sup>

A concentração de determinado fármaco variou bastante nas diversas regiões reportadas. Por exemplo, nos trabalhos realizados na China, a concentração de moxifloxacina detectada nas águas superficiais foi de 7,2 a 14 ng L<sup>-1</sup> e nas estações de tratamento de esgoto (ETE) de 17 a 72 ng L<sup>-1</sup>; essas concentrações foram inferiores às encontradas na Espanha, tanto em águas superficiais (205 ng L<sup>-1</sup>) como em ETE (200-2500 ng L<sup>-1</sup>).

No solo ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina foram detectadas em até 641,1, 288,3 e 1,6 ng g<sup>-1</sup>, enquanto que em amostras de lodo de ETE 1.040, 7.230, 7.790 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.<sup>46, 26, 28, 46</sup> A elevada concentração das quinolonas em amostras de lodo de ETE esta associado a transferência de massa durante o processo de purificação do efluente pelas diversas etapas da ETE.<sup>26</sup>

A ocorrência de antimicrobianos no meio ambiente é preocupante, visto a possibilidade do desenvolvimento de alterações em organismos presentes nas matrizes ambientais.

## 4. IMPACTO AMBIENTAL

Dentre os riscos reais de periculosidade que as quinolonas representam para os seres humanos e animais, pode-se destacar o aumento da resistência bacteriana. Fármacos podem afetar diretamente o meio ambiente e seu equilíbrio. Bactérias expostas a resíduos de antimicrobianos presentes em matrizes ambientais podem sofrer modificações em sua carga genética, resultando na resistência do micro-organismo ao fármaco a que o foi exposto.<sup>49-50</sup> Um número significativo de bactérias (tais como, coliformes fecais, *E. coli e enterococos*) com genes de resistência a antimicrobianos tem sido encontrado em estações de tratamento de esgoto.<sup>51-52</sup> O crescimento da resistência bacteriana a medicamentos torna necessário o uso de fármacos cada vez mais potentes e onerosos no tratamento de doenças.

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;<sup>53-54</sup> as quinolonas possuem potencial para afetar a comunidade microbiana, podendo afetar seriamente o processo de degradação da matéria orgânica.

A disposição contínua no meio ambiente desperta a preocupação quanto à possibilidade de bioacumulação e persistência, devido às características recalcitrantes das quinolonas.<sup>54</sup> Estudos de degradação de antimicrobianos são importantes para avaliar a eficácia das tecnologias de tratamento disponíveis.

#### **5. PROCESSOS DE REMOÇÃO**

#### **5.1. Processos convencionais**

Resíduos de quinolonas foram detectados em diversas matrizes, até mesmo em amostras de água potável destinada ao abastecimento público (Tabela 2). Isso indica que as estações convencionais de tratamento de água não são projetadas para promover a total remoção e/ou degradação desses compostos recalcitrantes.

A remoção de ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina foi avaliada por Vieno *et al.*<sup>55</sup> 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. Nas etapas de coagulação, floculação e sedimentação reagentes químicos para promover a aglutinação e precipitação dos poluentes presentes no efluente e não a oxidação dos mesmos.

Batt *et al.*<sup>40</sup> monitoraram a concentração de ciprofloxacina em quatro estações de tratamento de esgoto. Em três delas, havia tratamento terciário com etapa de cloração e/ou

fotólise. Até a etapa secundária do tratamento, onde são removidas as maiores cargas de matéria orgânica e os sólidos, registrou-se 50% de degradação do antimicrobiano. Dos tratamentos terciários empregados, a cloração não provocou efeito no tratamento do efluente e a fotólise foi ineficaz, sendo responsável por uma baixa remoção do fármaco detectado na entrada da estação: aproximadamente 25%.

Lin *et al.*<sup>23</sup> avaliaram a presença e remoção de fármacos, inclusive duas quinolonas, em estações de tratamento de esgoto. Observaram que, mesmo atingindo índices de remoção de 46 e 88% para ácido nalidíxico e ofloxacina, respectivamente, a eficácia do processo de lodos ativados na remoção de fármacos foi variável. Além disso, os índices de remoção de fármacos não indicam, necessariamente, a degradação dos mesmos, uma vez que o lodo da ETE pode apresentar uma concentração do contaminante até 1000 vezes maior do que a encontrada no efluente.<sup>56</sup> Lai e Lin<sup>11</sup> comprovaram a ineficiência dos processos aeróbio e anaeróbio na degradação de flumequina e ácido oxolínico.

Apesar dos processos biológicos serem capazes de remover parte dos antimicrobianos presentes no afluente contaminado, o sistema de lodos ativados pode ser prejudicado pela presença de elevadas concentrações das quinolonas, conferindo toxicidade ao meio.<sup>48,57</sup>

Processos que utilizam cloro têm sido frequentemente usados nas ETA para garantir a desinfecção de águas destinadas ao abastecimento público. As várias espécies comumente utilizadas (hipoclorito, cloro e dióxido de cloro) possuem alto potencial de redução  $(E_{ClO-} = 1,48 \text{ V}, E_{Cl2} = 1,36 \text{ V} \text{ e } E_{ClO2} = 0,95 \text{ V})$ . A avaliação da degradação de quinolonas por cloração em estações tratamento de água e esgoto é escassa. Wang et al.<sup>14</sup> avaliaram a degradação de sete fluoroquinolonas (ácido pipemídico -0,30  $L^{-1}$ , mg ciprofloxacina - 0,33 mg  $L^{-1}$ , enrofloxacina - 0,36 mg  $L^{-1}$ , flumequina - 0,26 mg  $L^{-1}$ , lomefloxacina - 0,35 mg L<sup>-1</sup>, norfloxacina - 0,32 mg L<sup>-1</sup> e ofloxacina - 0,36 mg L<sup>-1</sup>) em efluentes

de ETA e ETE utilizando-se o dióxido de cloro ( $C_{CIO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ ). Nesse estudo, foi observado que a flumequina, em ambos os efluentes, não sofreu degradação, mesmo após um longo período de contato (24 h). O mesmo foi observado para o ácido pipemídico, uma vez que a degradação máxima foi de 10%. Por outro lado, a adição de ClO<sub>2</sub> promoveu a redução da concentração das fluoroquinolonas ciprofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina, enrofloxacina e ofloxacina. Na ETE, ofloxacina e enrofloxacina foram totalmente oxidadas após 30 min de reação e, em ETA, o processo de cloração promoveu a degradação de 80 e 75% da ofloxacina e da enrofloxacina, respectivamente. Dodd *et al.*<sup>58</sup> já haviam reportado a rápida oxidação de enrofloxacina com hipoclorito: 50% de degradação após 3 min de reação. Mais recentemente, Najjar *et al.*<sup>59</sup> verificaram que a levofloxacina (0,04 mg L<sup>-1</sup>), assim como a enrofloxacina, foram rapidamente degradadas (1 min) usando hipoclorito de sódio como oxidante ( $C_{NaCIO} = 1,14 \text{ mg } L^{-1}$ ).

## 5.2. Fotólise

A radiação UV compreende os comprimentos de onda variando entre 100 e 400 nm do espectro eletromagnético, entre os raios-X e luz visível. A radiação UV pode ser classificada em UV-vácuo (100-200 nm), UV-C (200-280nm), UV-B (280-315 nm) e UV-A (315-400 nm). A radiação UV é normalmente obtida por meio de lâmpadas de vapor de mercúrio, as quais podem ser de baixa pressão, emissão em comprimentos de onda próximos a 254 nm, e de média pressão, com emissão de 180 a 370 nm.<sup>60</sup>

Fluoroquinolonas são resistentes a alterações de temperatura ou hidrólise, porém são sensíveis à radiação ultravioleta.<sup>61</sup> A fotólise depende da absorção da radiação pelo composto alvo. Em amostras de rios, lagos e efluentes ETE, onde a elevada turbidez e cor dificultam a permeabilidade da luz pela solução, a fotodecomposição de poluentes orgânicos dissolvidos pode não ocorrer ou sofrer perda da eficácia.

As quinolonas possuem duas faixas características de banda de absorção na região do ultravioleta, uma entre 240 e 300 nm e outra, de menor intensidade, entre 300 a 380 nm, devido aos anéis aromáticos presentes na estrutura desses compostos.<sup>62</sup>

Sirtori *et al.*<sup>63</sup> demonstraram que 84% da flumequina (concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>) em água deionizada foi degradada por fotólise usando radiação solar simulada (300-800 nm); porém, em solução marinha sintética, essa eficiência caiu para 66%. Pouliquen *et al.*<sup>64</sup> não conseguiram uma eficiência superior a 9,1% na degradação de flumequina (1 mg L<sup>-1</sup>) e ácido oxolínico (1 mg L<sup>-1</sup>) em efluente sintético, utilizando um sistema com radiação solar. Por outro lado, sarafloxacina, lomefloxacina, difloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina mostraram-se fotossensíveis à radiação ultravioleta e solar, com degradação superior a 50% em menos de 1 h de exposição, mesmo quando utilizada uma concentração na ordem de  $\mu$ g L<sup>-1.65-69</sup>

Hapeshi *et al.*<sup>70</sup> verificaram que 40% da ofloxacina (concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>) em água ultrapura foram degradadas sob radiação ultravioleta em 240 min. Não foi observada remoção de toxicidade da solução utilizando *Daphnia magna* como organismo teste. Destaca-se que a eficiência da fotólise na degradação do fármaco depende da sua estrutura, da sua concentração e da matriz em que o mesmo se encontra. Em geral, as quinolonas, quando expostas a fontes de radiação ultravioleta artificiais, se mostraram suscetíveis à degradação.

Dada a baixa eficiência dos métodos convencionais e devido ao longo tempo de exposição à radiação ultravioleta necessário para a degradação de quinolonas,<sup>11,14,58,59,63-67,69-80</sup> conforme apresentado na Tabela 4, torna-se importante o estudo e a avaliação de tratamentos avançados.

23

Quinolona	C <sub>inicial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Tratamento Proposto/Condições	Resultados	Ref.
,	232	Água ultrapura	UV <sub>350nm</sub> , 60 min	36% de degradação	71
Ácido nalidíxico	48	Efluente sintético	Biorreator com membrana em conjunto com O <sub>3</sub> $C_{03} = 68.7 \text{ mg L}^{-1}, 30 \text{ min}$	100% de degradação	72
	261	Água ultrapura	UV <sub>350nm</sub> , 60 min	7% de degradação	71
Ácido oxolínico	1	(A) Água ultrapura; (B) água superficial (França, Nantes), (C) água marinha sintética (40% NaCl)	$\lambda = 300-800 \text{ nm}, 14 \text{ dias}$	(A) 2%, (B) 2,8% e (C) 8,3% de degradação	64
	20	Água superficial (Taiwan, Syuejia)	<ul> <li>(a) processo anaeróbio e aeróbio,</li> <li>12 dias; (b) exposição radiação solar, 12 dias</li> </ul>	(a) 0 % e (b) 100% de degradação	11
	303	Água ultrapura	UV <sub>350nm</sub> , 60 min	39% de degradação	71
Ácido pipemídico	0,303	(A) água superficial; (B) Afluente de ETE (sudeste dos EUA)	Cloração: $C_{CIO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ , 30 min	(A) ∼10% e (B) ∼5% de degradação	14
	331	Água ultrapura	UV <sub>350nm</sub> , 60 min	34% de degradação	71
	0,331	<ul><li>(A) água superficial; (B)</li><li>Afluente de ETE</li><li>(sudeste dos EUA)</li></ul>	Cloração: $C_{ClO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ , 30 min	(A) 20% e (B) 30% de degradação	14
Ciproflovacina	0,5	(A) água potável; (B) efluente de ETE	Cloração: $C_{CIO} = 12 \text{ mg L}^{-1}, 60 \text{ min}$	(A) e (B) 90% de degradação	58
Cipronoxaema	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	UV <sub>310nm</sub> ,12W m <sup>-2</sup> , 60 min	100% de degradação	73
	0,2	Efluente hospitalar (Brasil, Santa Maria)	UV (125W-média pressão), 300 min	95% de degradação e 20% de mineralização	67
	1,29 x 10 <sup>-4</sup>	Afluente de ETE (Suíça, Lausanne)	UV <sub>254nm</sub> ,25w, 10 min	48% de degradação	74
Danofloxacina	0,02	Água superficial (Itália, Pavia)	UV <sub>310nm</sub> ,12W m <sup>-2</sup> , 60 min	100% de degradação	73
Difloxacina	(A) 10,0 (B) 5,0 (C) 1,0	Água ultrapura	$\lambda = 290\text{-}800 \text{ nm}, 500 \text{ W m}^{-2}$	(A) $k = 0.82 h^{-1}$ , (B) $k = 1.0 h^{-1}$ , (C) $k = 2.23 h^{-1}$	65
	10	Água ultrapura	$\lambda = 290-800 \text{ nm}, 500 \text{ W m}^{-2}$	$t_{1/2} = 0,88 h$	66
	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	UV <sub>310nm</sub> ,12Wm <sup>-2</sup> , 60 min	100% de degradação	73
	0,359	(A) água superficial; (B) Afluente de ETE (sudeste dos EUA)	Cloração: $C_{CIO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ , 30 min	(A) 75% e (B) 100% de degradação	14
	0,46	<ul><li>(A) água potável; (B) efluente de ETE</li></ul>	Cloração: $C_{ClO} = 4,6 \text{ mg } L^{-1}, 3$ min	(A) 45% e (B) 50% de degradação	58
Enrofloxacina	3,59	<ul> <li>(A) Água deionizada,</li> <li>(B) água superficial</li> <li>(EUA, Lago Josephine, St. Paul)</li> </ul>	Radiação solar	(A) k = 0,435 min <sup>-1</sup> , (B) k = 0,261 min <sup>-1</sup>	69
	10	Água ultrapura	$\lambda$ = 300-800 nm, 500 W: (a) pH 3, (b) pH 6,9, (c) pH 11	(a) $k = 1,2 \ 10^{-3} \ min^{-1}$ , (b) $k = 1,1 \ 10^{-2}$ min <sup>-1</sup> , (c) $k = 8,4 \ 10^{-3}$ min <sup>-1</sup>	75
	18	Água ultrapura	60 min: (a) UV <sub>254nm,30W</sub> , (b) UV <sub>360nm,36W</sub>	(a) 50% e (b) 0% de degradação	76
	20	Água ultrapura	UV <sub>300-400nm</sub> ,500W m <sup>-2</sup> , 60 min	10% de degradação e não houve alteração da atividade antimicrobiana	77
Flumequina	0,5	Água ultrapura	UV <sub>254nm,15W</sub> , 60 min	91% degradação e completa remoção da atividade antimicrobiana	78
	0,5	Água ultrapura	$C_{H202} = 34,0 \text{ mg } L^{-1}, 60 \text{ min}$	10% degradação e 18% de remoção de atividade antimicrobiana	78
	20	Água superficial (Taiwan, Syuejia)	<ul> <li>(a) processos anaeróbio e aeróbio,</li> <li>12 dias; (b) exposição radiação solar, 12 dias</li> </ul>	(a) 0 % e (b) 100% de degradação	11

**Tabela 4.** Aplicação de processos convencionais para a degradação de quinolonas em matrizes aquosas.

Tabela 4. continuação

Quinolona	C <sub>inicial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Tratamento Proposto/Condicões	Resultados	Ref.
	1	(A) Água ultrapura; (B) água superficial (França, Nantes), (C) água marinha sintética (40% NaCl)	$\lambda = 300-800$ nm, 14 dias	(A) 11%, (B) 1,8% e (C) 9,1% de degradação	64
Flumequina	20	<ul> <li>(A) Água deionizada;</li> <li>(B) água marinha sintética (23,5 g L<sup>-1</sup> NaCl)</li> </ul>	$\lambda = 300-800 \text{ nm}, 250 \text{ W m}^{-2}, 30 \text{ h}$	(A) 84% e (B) 66% de degradação	63
	2,6	(A) água potável e (B) esgoto tratado (sudeste dos EUA)	Cloração: $C_{ClO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ , 24 h	(A) e (B) 0% de degradação	14
	0,1	Esgoto tratado (Espanha, Almeria) na presença de outras 14 quinolonas	$C_{\rm H202} = 50 \text{ mg L}^{-1}, 15 \text{ min}$	10% de degradação	79
Lough	(A) 0,36 (B) 0,04	Água ultrapura	(a) $C_{NaOCI} = 2,13 \text{ mg } \text{L}^{-1} \text{ e}$ $C_{Na2S2O3} = 2,13 \text{ mg } \text{L}^{-1}, 50 \text{ min};$ (b) $C_{NaOCI} = 1,14 \text{ mg } \text{L}^{-1}, 1 \text{ min}$	(A,a) $k = 26 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1} \text{ e}$ (B,b) $k = 4400 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$	59
Levofloxacina	20	Água ultrapura	$Ultrassom + V_{CC14} = 0,02 \text{ mL}, 20$ min	70% de degradação	80
	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	UV <sub>310nm,12W m</sub> <sup>-2</sup> , 60 min	72% de degradação	73
Lomefloxacina	10	Água ultrapura	$UV-A_{4Wm}^{-2}$ , 25 min	80% de degradação	82
Marbofloxacina	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	$UV_{310nm,12Wm}^{-2}$ , 60 min	95% de degradação	73
Moxifloxacina	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	$UV_{310nm,12Wm}^{-2}$ , 60 min	60% de degradação	73
	319	Água ultrapura	UV <sub>350nm</sub> , 60 min	26% de degradação	71
	31,9	Água ultrapura	UV <sub>254nm</sub> , 120 min	50% de degradação	82
	80	Água ultrapura	UV (125 W – média pressão), 60 min	0% de mineralização	83
	20	Água ultrapura	UV <sub>365nm,15W</sub> , 60 min	9,1% de degradação	84
Norfloxacina	3,19	<ul> <li>(A) Agua deionizada,</li> <li>(B) água superficial</li> <li>(EUA, Lago Josephine, St. Paul)</li> </ul>	Radiação solar	(A) $k = 0,448 \text{ min}^{-1}$ , (B) $k = 0,337 \text{ min}^{-1}$	69
	2,7 x 10 <sup>-5</sup>	Afluente de ETE (Suíça, Lausanne)	UV <sub>254nm</sub> ,25W, 10 min	36% de degradação	74
	20	Água ultrapura	UV (150W-média pressão), 32 min	100% de degradação, 31% de mineralização, remoção de 85% da atividade antimicrobiana (bactéria <i>P.</i> <i>putida</i> ), remoção de 87% da toxicidade ( <i>V. fischeri</i> )	85
Ofloxacina	0,361	(A) água superficial; (B) Afluente de ETE (sudeste dos EUA)	Cloração: $C_{ClO2} = 1 \text{ mg } L^{-1}$ , 30 min	(A) 80% e (B) 100% de degradação	14
	4,1 x 10 <sup>-5</sup>	Efluente de ETE (Suíça, Lausanne)	UV <sub>254nm</sub> ,25w, 10 min	65% de degradação	74
	10	Água ultrapura	UV <sub>350-400nm</sub> ,9W, 240 min	40% de degradação	70
	5,2 x 10 <sup>-3</sup>	Afluente de ETE (Espanha, Madrid)	Lodos ativados	Remoção de 64,1%	86
Saraflovacina	10,0	Água ultrapura	$\lambda = 290-800 \text{ nm}, 500 \text{ W m}^{-2}$	$k = 0,26 h^{-1}$	65
Saranoxacilla	10	Água ultrapura	$\lambda = 290-800 \text{ nm}, 500 \text{ W m}^{-2}$	$t_{1/2} = 2,69 h$	66

#### 5.3. Processos oxidativos avançados

Os POA podem ser definidos como processos baseados na formação do radical hidroxila ('OH), um forte oxidante não seletivo com capacidade de mineralizar compostos orgânicos, devido ao seu elevado potencial de redução (E = 2,73 V), superior ao dos oxidantes convencionais.<sup>87-88</sup> Os radicais hidroxila se destacam frente a outros oxidantes visto a sua capacidade de promover desinfecção e,<sup>89</sup> principalmente, de mineralizar compostos orgânicos recalcitrantes,<sup>90-91</sup> como por exemplo, antimicrobianos presentes em matrizes aquosas.<sup>16</sup>

O uso da radiação solar e de lâmpadas de que emitem radiação ultravioleta tem se mostrado indicado para a degradação de quinolonas em solução aquosa quando o emprego se dá em conjunto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, Fe(II) e TiO<sub>2</sub>,  $^{13,61,67,70,73,74,76-79,82,83,85,92-117}$  conforme apresentado na Tabela 5.

## 5.3.1. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O processo oxidativo avançado  $UV/H_2O_2$  gera radicais hidroxila quando dois processos muito conhecidos são combinados: um físico (fotólise) e outro oxidativo (peroxidação), conforme Equação 1.

$$H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2 \text{ OH}$$
(1)

Rivas *et al.*<sup>82</sup> verificaram a eficiência do processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na degradação da norfloxacina em solução aquosa; a radiação UV, por si só, não foi capaz de degradar esse fármaco.

Quinolona	C <sub>inicial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Processo/Condições	Resultados	Ref.
	58	Água ultrapura	$UV/TiO_2/H_2O_2$ : TiO <sub>2</sub> impregnado em filme (TiO <sub>2</sub> -Fe(II)) + C <sub>H2O2</sub> = 108,8 mg L <sup>-1</sup> e radiação solar, 120 min	100% de mineralização	92
Ácido nalidíxico	45	<ul> <li>(A) Água</li> <li>desmineralizada, (B)</li> <li>água salina (5 g L<sup>-1</sup>)</li> <li>NaCl (C) efluente</li> <li>industrial simulado</li> </ul>	Foto-Fenton: $C_{H202} = 200 \text{ mg L}^{-1} \text{ e}$ $C_{Fe(II)} = 2 \text{ mg L}^{-1} (A \text{ e B}) \text{ e } 20 \text{ mg L}^{-1}$ (C), pH 4 e UV <sub>354nm</sub> , 40 min	(A) e (B) 100%, (C) 95% de degradação	93
	0,1 x 10 <sup>-3</sup>	Amostra de ETE (Japão)	$UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 7.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ e}$ $UV_{254nm,21,8W}$ , 5 min	100% de degradação	94
Ácido oxolínico	20	Água ultrapura	$\begin{array}{c} \textbf{UV/TiO_2: } C_{\text{TiO2}} = 1 \text{ g } L^{-1},  \textbf{UV}_{365\text{nm},14\text{Wm}}^{-2}, \\ \textbf{pH } 7,5,  30 \text{ min} \end{array}$	100% de degradação e total remoção da atividade antimicrobiana	95
	33,1	Água ultrapura na presença de outras 4 quinolonas	UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e } \lambda > 400 \text{ nm},$ 450 W, 60 min	100% de degradação	61
	33,1	Água ultrapura	UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e } \lambda > 400 \text{ nm},$ 450 W, 120 min	100% de degradação e de remoção da atividade antimicrobiana	96
Ciprofloxacina	1,29 x 10 <sup>-4</sup>	Amostra de ETE (Suíça, Lausanne)	(a) $UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{254nm,25W}$ , 10 min; (b) <b>Fenton</b> : $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , 30 min; (c) <b>foto-Fenton</b> : $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{ e } C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{254nm_25W}$ , 10 min; (d) <b>foto-Fenton</b> : $= C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e}$ $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , radiação solar, 90 min	(a) 69%; (b) 60%; (c, d) 100% de degradação	74
	33,1	Água ultrapura	$\begin{array}{c} {\bf UV/TiO_2:} \ C_{\rm TiO2} = 1,5 \ g \ L^{-1} \ e \\ {\bf UV}_{\rm 365nm,125W,} \ 10 \ min: (a) \ pH \ 3, (b) \ pH \ 5, \\ (c) \ pH \ 7, (d) \ pH \ 9 \ (e) \ pH \ 11 \end{array}$	(a) 55%, (b) 75%, (c) 95%, (d) 95% (e) 45% de degradação	97
	0,2	Esgoto hospitalar (Brasil, Santa Maria)	(a) $O_3$ : 225 mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> , pH 9, 60 min; (b) $O_3/H_2O_2$ : 225 mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> O <sub>3</sub> e C <sub>H2O2</sub> = 500 mg L <sup>-1</sup> , pH 9, 60 min; (c) UV/TiO <sub>2</sub> : C <sub>TiO2</sub> = 0,571 g L <sup>-1</sup> e UV-A <sub>125W</sub> , pH 3, 60 min	(a) 90%, (b) 95%, (c) 100% de degradação	67
	1,04 x 10 <sup>-3</sup>	Amostra de ETE (Espanha, Almeria)	Foto-Fenton: $C_{H202} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)}$ = 5 mg L <sup>-1</sup> , $\lambda$ = 290-800 nm, 30 W m <sup>-2</sup> , pH 3, 50 min	100% de degradação	98
	1	Água ultrapura	$ \begin{array}{l} \textbf{Foto-Fenton: } C_{H202} = 11 \ \text{mg } L^{-1} \ e \ C_{Fe(II)} \\ = 0,36 \ \text{mg } L^{-1}, \ UV_{365-410 \text{nm},15W}, \\ pH \ 2,5, \ 4,5 \ e \ 6,5, \ 10 \ \text{min} \end{array} $	pH 2,5 e 4,5: degradação 90%; pH 6,5: degradação de 50%	99
	15	Água deionizada	(a) UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e}$ UV <sub>254nm,389µWcm</sub> <sup>-2</sup> , pH 10, 15 min (b) UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e}$ UV <sub>365nm,485µWcm</sub> <sup>-2</sup> , pH 10, 15 min	(a) 70 e (b) 60% de degradação	100
Danofloxacina	0,02	Água superficial (Itália, Pavia)	<b>UV/TiO<sub>2</sub></b> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1}$ , $UV_{310nm,12W}$ m <sup>-2</sup> , 20 min	100% de degradação	73
	35,9	Água ultrapura na presença de outras 4 quinolonas	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e } \lambda > 400$ nm, 450 W, 60 min	100% de degradação	61
Enrofloxacina	158	Água ultrapura	BDD, 7,1 g L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 33 mAcm <sup>-2</sup> , pH 3: (a) <b>Eletroquímico</b> : 360 min; (b) <b>EletroFenton</b> : $C_{Fe(II)} = 28 \text{ mg L}^{-1}$ , 360 min; (c) <b>Foto-eletroFenton</b> : $C_{Fe(II)} = 28$ mg L <sup>-1</sup> e UV <sub>360nm,6W</sub> , 240 min; (d) <b>Foto-</b> <b>eletroFenton</b> : $C_{Fe(II)} = 28 \text{ mg L}^{-1}$ e radiação solar, 17 W m <sup>-2</sup> , 240 min	(a) 67%, (b) 78%, (c) 96% e (d) 97% de mineralização	101
	1,8 x 10 <sup>-4</sup>	Efluente de ETE (Espanha, região leste)	UV/TiO <sub>2</sub> : C <sub>TiO2</sub> = 0,2 g L <sup>-1</sup> , radiação solar, 30 W m <sup>-2</sup> , 6 h	90% de degradação	102
	20	Água ultrapura	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = \overline{0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e UV}_{254nm}},$ 30 min	100% de degradação e 80% de mineralização	77
Flumequina	20	Água ultrapura	<b>UV/TiO<sub>2</sub> (UV<sub>254nm</sub>):</b> (a) $C_{TiO2} = 1,6 \text{ g L}^{-1}$ <sup>1</sup> , (b) $C_{uréia-TiO2} = 1,6 \text{ g L}^{-1}$ , (c) $C_{tioureia-TiO2} = 1,6 \text{ g L}^{-1}$ , 15 min	(a) 55%, (b) e (c) 90% de degradação	13

**Tabela 5.** Aplicação de processos oxidativos avançados para a degradação de quinolonas em matrizes aquosas.

# Tabela 5. continuação

Quinolona	C <sub>inicial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Processo/Condições	Resultados	Ref.
	18	Água ultrapura	$\begin{array}{l} \textbf{UV/TiO_2:} (a) \ \text{TiO}_2 \ \text{imobilizado} \ (\text{cilindro} \\ de \ \text{vidro} \ \text{sintetizado}) \ e \ UV_{254nm,30W}, (b) \\ \textbf{TiO}_2 \ \text{imobilizado} \ e \ UV_{360nm,36W}, (c) \ C_{\text{TiO}2} \\ 1 \ g \ L^{-1} \ e \ UV_{254nm,30W} \ e \ (d) \ C_{\text{TiO}2} \ 1 \ g \ L^{-1} \ e \\ UV_{360nm,36W}, \ 60 \ \text{min} \end{array}$	Degradação: (a) 95%, (b) 90%, (c) 90%, (d) 80%; mineralização: (a) 80% e (b) 65%; remoção da atividade antimicrobiana: (a) e (c) 100%, (b) 50% e (d) 40%.	76
	20	Água ultrapura	(a) UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ e}$ radiação solar, 25 min, (b) Fenton (30 min) e foto-Fenton (15 min): $C_{H2O2} =$ 150 a 350 mg L <sup>-1</sup> e $C_{Fe(II)} = 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ e}$ radiação solar	Degradação de (a) 100%; (b) 10% para Fenton e 100% para foto-Fenton	103
	0,5	Água ultrapura	$UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 34 \text{ mg } L^{-1} \text{ e } UV_{254nm}$ , 30 min	98% de degradação e 100% de remoção da atividade antimicrobiana	78
	0,5	(A) Água sintética; (B) efluente sintético; (C) efluente de ETE na presença de outros 14 fármacos	UV/TiO <sub>2</sub> : TiO <sub>2</sub> imobilizado e $\lambda$ = 300- 800nm: (a) 30 min e (b) 60 min	(A,a) 100%, (B,b) 100% e (C,b) 50% de degradação	104
Flumequina 0	0,1	<ul> <li>(A) Água sintética; (B) esgoto sintético</li> <li>(Espanha, Almeria) na presença de outras 14 quinolonas</li> </ul>	(a) Fenton (15 min) e (b) foto-Fenton (60 min) modificado: $C_{H2O2} = 50$ mg L <sup>-1</sup> e $C_{Fe(II)} = 5$ mg L <sup>-1</sup> , pH 7 e radiação solar	(A,a) 50%, (A,b) 100%, (B,a) 45% e (B,b) 100% de degradação; toxicidade aumenta (V. <i>fischeri</i> ) após 30 min	105
	0,1	Esgoto tratado (Espanha, Almeria) na presença de outras 13 quinolonas	(a) Fenton (15 min) e (b) foto-Fenton (20 min) modificado: $C_{H2O2} = 50$ mg L <sup>-1</sup> e $C_{Fe(II)} = 5$ mg L <sup>-1</sup> , pH 5,2 e radiação solar	(a) 30% e (b) 100% de degradação	79
	26,1	Água ultrapura (presença de outras 4 quinolonas)	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e } \lambda > 400$ nm, 400 W, 60 min	60% de degradação	61
	0,5	Água ultrapura	$UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 50.0 \text{ mg } \text{L}^{-1} \text{ e}$ $UV_{254nm,15W}$ , 30 min	98% de degradação e 100% de remoção da atividade antimicrobiana	106
	0,5	Água ultrapura	(a) Fenton (15 min): $C_{H202} = 68 \text{ mg } L^{-1}$ e $C_{Fe(II)} = 28 \text{ mg } L^{-1}$ , pH 2,8; (b) foto-Fenton (60 min): $C_{H202} = 340$ mg $L^{-1}$ e $C_{Fe(II)} = 14 \text{ mg } L^{-1}$ , pH 2,8 e $UV_{254nm,15W}$	<ul> <li>(a) 40% de degradação e</li> <li>62% de remoção da</li> <li>atividade antimicrobiana</li> <li>(b) 94% de degradação e</li> <li>100% de remoção da</li> <li>atividade antimicrobiana</li> </ul>	107
	16,4	Água ultrapura	$O_3: C_{O3-consumido} = 31,2 \text{ mg } L^{-1}, \text{ pH } 10, 60$ min	$k = 3.8 \text{ mmol } L^{-1} \text{ min}^{-1},$ $t_{1/2} = 7.8 \text{ min}$	108
Levofloxacina	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	<b>UV/TiO<sub>2</sub></b> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1}$ , $UV_{310nm,12W}$ m <sup>-2</sup> , 20 min	100% de degradação	73
	0,5 x 10 <sup>-3</sup>	Amostra de ETE (Japão)	$UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 7,8 \text{ mg } \text{L}^{-1} \text{ e}$ $UV_{254\text{nm},21,8W}$ , 5 min	70% de degradação	94
Marbofloxacina	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1}$ , UV <sub>310nm,12W</sub> $m^{-2}$ , 20 min	100% de degradação	73
	0,05	Água superficial (Itália, Pavia)	$UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1}$ , $UV_{310nm,12W}$ m <sup>-2</sup> , 20 min	100% de degradação	73
Moxifloxacina	5 - 25	Água ultrapura	<b>UV/TiO<sub>2</sub></b> : $C_{TiO2} = 5.0 \text{ g L}^{-1}$ , UV <sub>365nm</sub> ,485 $\mu$ W/m <sup>2</sup> , 14 min	100% de degradação	109
	50	Água ultrapura	$UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 5.0 \text{ g L}^{-1}$ , $UV_{365nm,485\mu W/m}^2$ , 14 min	(A) 85% de degradação	110
	10	Água ultrapura	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = 1,0 \text{ g } L^{-1}, \lambda = 420 \text{ nm}, 70 \text{ min}$	100% de degradação	111
Norfloxacina	31,9	Água ultrapura na presença de outras 4 quinolonas	UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ e } \lambda > 400$ nm, 450 W, 60 min	100% de degradação	61
	31,9	Água ultrapura	$UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 91 \text{ mg } L^{-1}$ , $UV_{254nm}$ , pH 7, 55 min	100% de degradação	82
	79,8	Água ultrapura	$\overline{\mathbf{UV}/\mathrm{TiO}_2: \mathrm{C}_{\mathrm{TiO2}}} = 1 \mathrm{g L}^{-1} \mathrm{e}$ UV(médiapressão, 125 W), 60 min	100% de degradação e 70% de mineralização	83

# Tabela 5. continuação

Quinolona	C <sub>inicial</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Matriz	Processo/Condições	Resultados	Ref.
	1,38 x 10 <sup>-4</sup>	Efluente de ETE (Portugal, Febros)	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = 0.2 \text{ g } \text{L}^{-1} \text{ e } \text{UV}_{32kJ,L}^{-1}$	100% de degradação; não houve alteração da toxicidade	112
Norfloxacina	2,7 x 10 <sup>-5</sup>	Amostra de ETE (Suíça, Lausanne)	(a) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ , UV <sub>254nm,25W</sub> , 10 min; (b) Fenton: $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , 30 min; (c) foto-Fenton: $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , UV <sub>254nm,25W</sub> , 10 min; (d) foto-Fenton: $= C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , radiação solar, 90 min	(a) 100%; (b) 49%; (c, d) 100% de degradação	74
	5 x 10 <sup>-6</sup>	Efluente de ETE (Japão)	$UV/H_2O_2$ : $C_{H2O2} = 7.8 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{254nm,65W \pm 0.25mWcm}^{-2}$ , 5 min	69% de degradação	94
	10	Água ultrapura	<ul> <li>(a) O<sub>3</sub>/UV: C<sub>03</sub> = 15 mg L<sup>-1</sup>, UV<sub>313nm&gt;700W</sub>, 15 min</li> <li>(b) UV/TiO<sub>2</sub>: C<sub>0</sub> = 100 mg L<sup>-1</sup>, UV<sub>313nm&gt;700W</sub>, 30 min</li> </ul>	(a) e (b) 100% de degradação	113
	10	Efluente de ETE (Chipre, Limassol)	(a) UV/TiO <sub>2</sub> : $C_{TiO2} = 3 \text{ g } L^{-1}$ , radiação solar, 120 min; (b) foto-Fenton: $C_{H2O2} =$ 92 mg L <sup>-1</sup> e $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg } L^{-1}$ , pH 3, radiação solar e 30 min	<ul> <li>(a) 60% de degr., 30% de mineralização e aumento de 90% da toxicidade (<i>D. magna</i>);</li> <li>(b) 100% de degradação, 50% de mineralização e aumento de 25% da toxicidade (<i>D. magna</i>)</li> </ul>	114
	20	Água ultrapura	UV/TiO <sub>2</sub> : C <sub>TiO2</sub> = 1 g L <sup>-1</sup> , UV (média pressão, 150 W), 32 min	100% de degr., 31% de mineralização, remoção de 84% da atividade antimicrobiana (bactéria <i>P. putida</i> ) e remoção de 86% da toxicidade ( <i>Vibrio fischeri</i> )	85
	41 x 10 <sup>-6</sup>	Amostra de ETE (Suíça, Lausanne)	(a) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ , UV <sub>254nm,25W</sub> , 10 min; (b) Fenton: $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1} e C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , 30 min; (c) foto-Fenton: $C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1}$ $e C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , UV <sub>254nm,25W</sub> , 10 min; (d) foto-Fenton: $= C_{H2O2} = 50 \text{ mg L}^{-1} e$ $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , radiação solar, 90 min	(a) 100%; (b) 49%; (c,d) 100% de degradação	74
Ofloxacina	10	Água ultrapura	(a) $UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 250 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{350-400nm,9W}$ , 240 min; (b) $UV/TiO_2/H_2O_2$ : $C_{TiO2} = 250 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{H2O2} = 47,6 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{350-400nm,9W}$ , 120 min; (c) $UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 500 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{350-400nm,9W}$ , 30 min	<ul> <li>(a) 100% de degr. e 92% de mineralização; (b) 70% de mineralização;</li> <li>(c) toxicidade aumentou de 40 para 90% de imobilização (<i>Daphnia</i> <i>magna</i>)</li> </ul>	70
	1,61 x 10 <sup>-3</sup>	Amostra de ETE (Espanha, Almeria)	$UV/TiO_2$ : $C_{TiO2} = 20 \text{ mg L}^{-1}$ , $UV_{300}$ . 400nm,24Wm <sup>-2</sup> , 300 min	85% de degradação	115
	0,1	Efluente de ETE (Chipre, Nicosia)	(a) Fenton: $C_{H202} = 75 \text{ mg L}^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , pH 2,8-2,9, 180 min; (b) Foto- Fenton: $C_{H202} = 75 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , radiação solar, pH 2,8-2,9, 180 min; (b) Foto-Fenton: $C_{H202} = 75 \text{ mg L}^{-1}$ <sup>1</sup> e $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}$ , radiação solar, pH 7, 45 min	(a) 78,6% de degr., (b) 100% de degr. e 21% de mineralização; (c) 100% de degr. e 12% de mineralização; aumento da toxicidade de 13,3% para 60% ( <i>Daphnia</i> <i>magna</i> )	116
	0,1	Água superficial (Espanha, Almeria)	Foto-Fenton: $C_{H202} = 12 \text{ mg } L^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)}$ = 5 mg L <sup>-1</sup> , $\lambda > 400 \text{ nm}$ , 30 W, pH 5, 20 min	100% de degradação	117
	2 x 10 <sup>-4</sup>	Efluente de ETE (Espanha, região leste)	<b>UV/TiO<sub>2</sub>:</b> $C_{TiO2} = 0.2 \text{ g L}^{-1}$ , radiação solar, 30 W m <sup>-2</sup> , 6 h	78,5% de degradação	102
	1 x 10 <sup>-3</sup>	Amostra de ETE (Espanha, Almeria)	(a) Foto-Fenton: $C_{H202} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e}$ $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mg L}^{-1}, \lambda = 290\text{-}800 \text{ nm}, 30 \text{ W}$ $\text{m}^{-2}, \text{ pH 3}, 50 \text{ min}; (b) \text{ Foto-Fenton}$ <b>modificado:</b> $C_{H202} = 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ e } C_{Fe(II)}$ $= 5 \text{ mg L}^{-1}, \lambda = 290\text{-}800 \text{ nm}, 30 \text{ W m}^{-2},$ pH 7, 50  min	(a) 100% e (b) 97% de degradação	98

De La Cruz *et al.*<sup>74</sup> comprovaram o aumento na eficácia da degradação de 32 poluentes detectados em um efluente de ETE (inclusive três fluoroquinolonas) quando empregado o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao invés da radiação UV<sub>254nm</sub> isoladamente. Após 10 min de irradiação, 36% da norfloxacina, 65% da ofloxacina e 48% da ciprofloxacina foram degradadas pelo processo físico. Adicionando 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e aplicando essa mesma dose de radiação (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), observaram que 100% da concentração das fluoroquinolonas ofloxacina e norfloxacina presentes no efluente foram degradadas após 10 min de reação. Porém, para a ciprofloxacina, a total degradação foi observada apenas após 30 min de reação.

Kim *et al.*<sup>94</sup> aplicaram a fotólise para o tratamento de uma solução contendo resíduos de 39 fármacos. Para a remoção desses compostos da solução aquosa, foi necessária uma dose de radiação UV de 2768 mJ cm<sup>-2</sup>, a qual pode ser considerada alta quando comparada aos 40-140 mJ cm<sup>-2</sup> necessários para promover a desinfecção. Porém, com a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve um aumento significativo na porcentagem de remoção dos contaminantes, com o emprego de uma menor dose de radiação UV (923 mJ cm<sup>-2</sup>). O mesmo foi constatado por Da Silva *et al.*<sup>78</sup> durante a avaliação da degradação de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de flumequina por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neste estudo, reduzindo a dose de radiação UV pela metade (de 5677 para 2839 mJ cm<sup>-2</sup>), na presença de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultados similares foram obtidos com relação à degradação da flumequina (aproximadamente 98%). Além disso, a atividade antimicrobiana da solução submetida ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 min foi semelhante à obtida quando empregado 5677 mJ cm<sup>-2</sup> (60 min) de radiação UV isoladamente.

## 5.3.2. Fenton e foto-Fenton

O POA reagente de Fenton produz radicais OH como resultado da clivagem de peróxido de hidrogênio catalisado por Fe(II), que por sua vez é oxidado a Fe(III), como apresentado na

Equação 2.<sup>118-119</sup> A taxa de reação diminui durante o processo devido ao consumo dos reagentes (Fe(II) e  $H_2O_2$ ) e da redução extremamente lenta do Fe(III) para Fe(II), conforme apresentado na Equação 3.<sup>118</sup> Quando o processo Fenton é conduzido sob radiação UV (processo foto-Fenton), ocorre a foto-redução do Fe(III) para Fe(II). Esta regeneração do Fe(II) gera, subsequentemente, mais radicais hidroxila no meio aquoso, conforme apresentado na Equação 4.<sup>118</sup>

O reagente de Fenton foi e continua sendo bastante empregado na remoção de cor de efluentes das indústrias têxtil, de couro e de papel. Na última década, o processo foto-Fenton tem se mostrado uma alternativa eficiente no processo de degradação de contaminantes emergentes.<sup>120</sup>

$$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + (OH)^2 + OH (k = 53-76 L^{-1} mol s)$$
(2)

$$Fe(III) + H_2O_2 \rightarrow Fe(II) + (OH)^2 + O_2H + H^+ (k = 1-2 \times 10^{-2} L^{-1} \text{ mol s})$$
(3)

$$Fe(III) + H_2O + h\nu \rightarrow Fe(II) + H^+ + OH$$
(4)

A eficácia dos processos Fenton e foto-Fenton depende das concentrações e da faixa do pH, que deve estar entre 2,5 e 4.<sup>121</sup> Caso o pH seja inferior a 2, haverá uma diminuição dos 'OH disponíveis no meio devido ao sequestro dos radicais formados, pelo H<sup>+</sup>. Em pH acima de 4, o processo foto-Fenton pode sofrer perda de eficácia devido à precipitação de complexos de ferro, inibindo assim a foto-redução do Fe(III). É importante salientar ainda que as reações de foto-Fenton na faixa de pH de 2,8 a 4 são mais eficientes sob radiação solar ( $\lambda = 290-800$  nm).<sup>93</sup> Porém, reações de foto-Fenton modificado, em pH neutro, têm demonstrado serem mais eficiente para a degradação de antimicrobianos sob radiação UV<sub>254nm</sub>.<sup>74</sup>

A fonte de Fe(II) comumente utilizada na literatura é o FeSO<sub>4</sub>.7 $H_2O$ .<sup>79,93,98,103,105,107,120</sup> A proporção entre Fe(II) e  $H_2O_2$ , para atingir a eficiência máxima, deve ser avaliada, uma vez essa relação varia de acordo com o composto a ser degradado e a matriz em que o mesmo se encontra.

A eficácia dos processos Fenton e foto-Fenton no tratamento de um esgoto sintético contendo 15 contaminantes emergentes, incluindo flumequina e ofloxacina, foi avaliado em um reator solar em escala piloto por Klamerth et al.<sup>105</sup> Os pesquisadores observaram que a adição de 5 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) e 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultou na redução máxima de 45% da concentração inicial de flumequina (0,1 mg L<sup>-1</sup>) presente no efluente. Porém, com a introdução da radiação solar no processo, a degradação da flumequina atingiu 100% após 60 minutos de reação, devido à regeneração de Fe(II), conforme mostrado na Equação 4. Devido ao rápido consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, doses extras de peróxido de hidrogênio (50 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionadas periodicamente para manter o reagente disponível no processo. É importante salientar que, apesar do processo foto-Fenton ter sido eficaz na degradação dos 15 contaminantes, a aplicação desse POA no tratamento do efluente de ETE resultou em uma solução com toxicidade maior que a inicial, quando utilizada a bactéria V. fischeri como organismo teste. Klamerth et al.<sup>79</sup> avaliaram a degradação desse mesmo efluente por Fenton e foto-Fenton modificado e constataram que, independentemente do tempo de reação para a degradação total dos poluentes, as reações com Fenton podem ser aprimoradas pela adição de oxalato de ferro e substâncias húmicas, com a vantagem da possibilidade de utilização do pH natural do efluente, ou seja, pH em torno de 7.

Rodrigues-Silva *et al.*<sup>107</sup> avaliaram a eficácia dos processos Fenton e foto-Fenton para a degradação de flumequina (0,5 mg L<sup>-1</sup>) em solução aquosa. Mesmo que a degradação máxima observada tenha sido de 94% ( $C_{Fe(II)}$  = 14 mg L<sup>-1</sup>,  $C_{H2O2}$  = 340 mg L<sup>-1</sup> e UV<sub>254nm</sub> = 5677 mJ cm<sup>-2</sup>), verificaram que a toxicidade da solução para *V. fischeri* não foi alterada após o processo foto-Fenton e que a atividade antimicrobiana da solução foi totalmente removida. Os pesquisadores

concluíram também que os excessos de Fe(II) e/ou  $H_2O_2$  resultam na perda de eficiência do processo Fenton e foto-Fenton.

De acordo com Sirtori *et al.*<sup>93,103</sup>, as fluoroquinolonas ácido nalidíxico e flumequina presentes em soluções aquosas podem ser degradadas por foto-Fenton; porém, a complexidade das matrizes (como efluentes industriais), a salinidade das amostras e a elevada concentração de cloro presente nos efluentes podem alterar a cinética de degradação.

#### 5.3.3. UV/TiO<sub>2</sub>

A fotocatálise envolve o emprego de semicondutores, os quais são caracterizados pela banda de valência, banda de condução e a diferença de energia entre elas, o *band-gap*. Dentre os fotocatalisadores, o dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) destaca-se devido a alta banda de foto-sensibilidade, 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. A fotocatálise pode ser procedida de duas maneiras: empregando semicondutor em suspensão ou imobilizado.<sup>122-123</sup>

A absorção de fótons, pelo semicondutor, com energia maior que o *band gap* resulta na promoção do elétron da camada de valência para a de condução. A promoção para o estado eletronicamente excitado ocorre pela irradiação UV na superfície do semicondutor. Para que seja gerado um elétron lacuna (Equação 5), a energia necessária para superar o band gap necessita ser superior a 3,2 eV.<sup>124</sup> Nas Equações 5 a 10 são apresentadas as reações envolvidas durante a formação dos radicais pelo processo fotocatálitico com TiO<sub>2</sub>.<sup>123</sup>

$$TiO_2 + hv \rightarrow e^- + h^+$$
(5)

$$O_2 + e^{-} \rightarrow O_2^{-}$$
 (6)

$$H_2O + h^+ \rightarrow OH + H^+ \tag{7}$$

$$O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$$
(8)

$$2 \operatorname{HO}_2 \rightarrow \operatorname{H}_2 \operatorname{O}_2 + \operatorname{O}_2 \tag{9}$$

$$H_2O_2 + O_2 \stackrel{\bullet}{\rightarrow} OH + OH^- + O_2 \tag{10}$$

A adsorção do composto alvo na superfície do TiO<sub>2</sub> é uma das principais etapas do mecanismo de reação da fotocatálise. No estudo de Paul *et al.*,<sup>61</sup> 5% da ciprofloxacina (1,65 mg L<sup>-1</sup>) foi adsorvida em 0,5 g L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> em suspensão em 5 min de contato. Rodrigues-Silva *et al.*<sup>106</sup> reportaram a adsorção máxima de 29,6% de flumequina (concentração inicial de 0,5 mg L<sup>-1</sup>) em 150 mg L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> após 30 min de agitação. Esse resultado está de acordo com o estudo de Palominos *et al.*,<sup>77</sup> os quais reportaram que a adsorção máxima de flumequina (concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>) em 1,5 g L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> foi de aproximadamente 26%. A adsorção de compostos no semicondutor varia conforme a concentração do poluente, concentração do adsorvente e da complexidade da matriz.

A fotocatálise com TiO<sub>2</sub> têm sido aplicada com sucesso na degradação de quinolonas presentes em soluções aquosas.<sup>13,61,67,70,73,76-77,83,95-97,100,102-104,106,109-111,113-114</sup> Dos trabalhos publicados, pouco]s são aqueles aplicados para a remoção de quinolonas nas concentrações reais presentes em efluentes. Bernabeu *et al.*<sup>102</sup> detectaram, em um efluente de ETE na Espanha, 2,0 x  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> de ofloxacina e 1,8 x  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> de enrofloxacina e aplicaram a fotocatálise como polimento (tratamento terciário), visando à remoção desses contaminantes. Utilizando 200 mg L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> em suspensão, após 6 horas de exposição à radiação solar, observaram a degradação de 78,5 e 90% da ofloxacina e enrofloxacina, respectivamente. Mesmo não sendo atingida a total remoção dessas fluoroquinolonas, observou-se que a fotocatálise foi altamente eficaz em relação à desinfecção, removendo 99% dos coliformes fecais após 1 h de tratamento.

No entanto, os autores ressaltaram que a aplicação em larga escala desse processo não seria tecnicamente vantajosa devido a necessidade de remoção do  $TiO_2$  ao final do processo, quando comparada ao processo de fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Palominos *et al.*<sup>77</sup> analisaram a degradação da flumequina utilizando TiO<sub>2</sub> em suspensão, na presença de uma fonte luminosa simulando a luz solar. Verificaram total degradação da flumequina após e 80% de mineralização após 30 min de ensaio. Além disso, não foi detectada atividade antimicrobiana nas soluções submetidas ao processo de degradação, indicando alteração da estrutura da quinolona estudada. Nieto *et al.*<sup>13</sup> utilizaram a oxidação fotocatalítica com dióxido de titânio na forma pura (TiO<sub>2</sub>), na presença de uréia (u-TiO<sub>2</sub>) e tiouréia (t-TiO<sub>2</sub>) (técnica de sol-gel) para a degradação de flumequina em solução aquosa, atingindo 55, 90 e 90% de degradação, respectivamente, após 15 min.

No processo de fotocatálise com TiO<sub>2</sub> em suspensão, a avaliação da faixa de concentração do catalisador a ser aplicada no processo é imprescindível para se atingir a máxima eficiência de degradação. Rodrigues-Silva *et al.*<sup>106</sup> utilizaram concentrações de TiO<sub>2</sub> em suspensão variando de 5 a 150 mg L<sup>-1</sup>, com o objetivo de degradar 0,5 mg L<sup>-1</sup> de flumequina em água ultrapura. Foi observada uma total degradação do fármaco após 30 min de radiação UV, utilizando 50 mg L<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>.

## 5.4. Ozônio

O ozônio possui elevado potencial de redução (E = 2,07 V), superior ao de compostos oxidantes, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o cloro. Em meio básico, decompõe-se levando à formação de radicais hidroxila, cujo potencial de redução é ainda mais elevado. Em altas concentrações, é um gás tóxico, tem um odor peculiar similar ao do cloro e sofre decomposição rápida em altas temperaturas. É instável em água, possuindo uma meia-vida de minutos, devendo, portanto, ser

produzido *in-situ* (no local e no momento a ser consumido). A decomposição do ozônio pode ser acelerada pelo aumento do pH, pela adição de peróxido de hidrogênio ou pela radiação UV.<sup>125-126</sup> Desta maneira, a oxidação de quinolonas durante a ozonização pode ocorrer via ozônio molecular (reação direta - predominante em meio ácido) ou radical hidroxila (reação indireta - predominante em meio básico). Em meio neutro, ambos oxidantes podem estar atuando.

Vários estudos têm avaliado a aplicação de ozônio para a remoção de fluoroquinolonas presentes em efluentes.<sup>31,67,72,82,108,127</sup> Nesses estudos, concluiu-se que, elevando-se o pH acima de 10, a eficiência da degradação aumentou.

Balcioglu e Otker<sup>127</sup> avaliaram a aplicação de ozônio em efluente de ETE sintético contendo enrofloxacina. Três valores diferentes de pH foram avaliados: 3, 7 e 12. A ozonização foi combinada com  $H_2O_2$  e com radiação  $UV_{254nm}$ . Os pesquisadores concluíram que a melhor condição de trabalho foi em pH 12, para o qual obtiveram resultados de remoção de enrofloxacina similares aos obtidos para o processo  $O_3/H_2O_2$ . O processo  $O_3/UV$  apresentou uma eficiência de 20% acima da obtida utilizando a fotólise isolamente.

Rivas *et al.*<sup>113</sup> concluíram que, mesmo que o processo de ozonização tenha sido capaz de degradar rapidamente 90% da norfloxacina presente no efluente, 70% do teor de carbono orgânico total inicial continuou presentes na solução, devido aos intermediários formados, os quais poderiam contribuir para a atividade antimicrobiana residual da solução.

## 6. INTERMEDIÁRIOS FORMADOS

Para que os produtos formados das reações entre os radicais hidroxila e as quinolonas possam ser identificados, normalmente utiliza-se a espectrometria de massas, massa em tandem e distribuição isotópica.<sup>66,68,73,85,93,95-97,101,103,106,107,128-130.</sup> As estruturas dos possíveis produtos formados são propostas baseando-se na composição elementar dos fármacos e mecanismos de

reações orgânicas apresentados na literatura especializada. Salienta-se que a identificação dos produtos formados durante os processos de degradação é uma etapa bastante trabalhosa devido às baixas concentrações em que esses intermediários se encontram. É importante ressaltar que, para comprovar a identidade dos intermediários formados e propostos é necessário a aquisição de padrões analíticos desses intermediarios, os quais nem sempre encontram-se disponíveis.<sup>97,130</sup>

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.<sup>130</sup>

A elevada concentração de compostos orgânicos presentes nos efluentes pode interferir na eficiência do POA, bem como dificultar o processo de identificação dos intermediários formados, devido à possibilidade de formação de produtos a partir dos outros compostos que são diferentes da molécula alvo do estudo, ou seja, dos interferentes.<sup>63,107,130</sup>

Além da presença de matéria orgânica, soluções contendo excesso de sais de sódio, potássio e amônio podem promover a formação de adutos. Adutos são íons formados pela combinação direta entre a molécula ionizada e outro íon que não seja um próton (H<sup>+</sup>); eles não se fragmentam quando empregada a energia de ionização comumente utilizada em análise de massa em tandem,<sup>131</sup> o que dificulta a sua caracterização ao longo do processo de degradação.

De acordo com Albini e Monti,<sup>132</sup> não é esperado que as fluoroquinolonas sofram rearranjo em sua estrutura química durante a exposição à radiação UV. A principal modificação que deve ocorrer na estrutura da fluoroquinolona durante o processo de fotólise é a perda do fluoreto (F<sup>-</sup>), seguida da eliminação do grupo carboxila (COOH).<sup>103,132</sup>

Sirtori *et al.*<sup>103</sup> e Klamerth *et al.*<sup>79</sup> constataram um aumento da concentração de F<sup>-</sup> em soluções aquosas (contendo flumequina e ofloxacina) submetidas aos processos foto-Fenton e fotocatálise. Os autores demonstraram que reações com 'OH provavelmente promovem também a

remoção do F<sup>-</sup> ligado ao C-6 das fluoroquinolonas avaliadas. Giraldo *et al.*<sup>95</sup> relataram que o processo de hidroxilação das quinolonas deve ocorrer por reações do tipo photo-Kolbe, resultando na substituição do grupo carboxila (COOH) ligado ao C-3, por um próton ou uma hidroxila. Sirtori *et al.*,<sup>63,103</sup> An *et al.*,<sup>97</sup> Rodrigues-Silva *et al.*,<sup>106-107</sup> Sturini *et al.*,<sup>73,129</sup> e Vasquez *et al.*<sup>85</sup> propuseram que as quinolonas ácido nalidíxico, ciprofloxacina, danofloxacina, ofloxacina e flumequina perdem o COOH durante reações com o radical hidroxila.

Liu *et al.*<sup>133</sup> propuseram que a principal rota de degradação da ciprofloxacina, norfloxacina e lomefloxacina ocorre na região alcalina (N-1 e/ou anel piperazínico) dessas fluoroquinolonas. Pretali *et al.*<sup>128</sup> concluíram que o caminho de degradação da marbofloxacina se inicia com reações no anel piperazínico, corroborando com o trabalho de Kusari *et al.*,<sup>66</sup> os quais avaliaram os produtos da degradação da sarafloxacina.

## 7. TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA RESIDUAL

## 7.1. Toxicidade

A compreensão de como um efluente tratado será reabsorvido pelo ambiente é uma peça importante para definir os ganhos com o processo aplicado. Os POA têm sido largamente empregados para o tratamento e remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos, assim como para aumentar a biodegradabilidade de efluentes. Entretanto, a oxidação incompleta de contaminantes pode resultar na formação de intermediários mais tóxicos do que o composto original. Por esse motivo, ensaios de monitoramento da toxicidade são desejáveis, principalmente quando a total mineralização dos contaminantes não é atingida.<sup>112</sup>

A cloração, um dos processos mais comumente usados nas ETA, foi aplicada na degradação da levofloxacina por Najjar *et al.*<sup>59</sup> Mesmo atingindo 93% de degradação da fluoroquinolona, houve uma aumento de 88% da toxicidade da solução, avaliada pela inibição da

fluorescência da bactéria *V. fischeri*). O mesmo foi observado por Li *et al.*<sup>31</sup> em soluções contendo enrofloxacina submetidas a fotólise: a inibição da fluorescência da *V. fischeri* aumentou de 26,5% para 67,2% em 60 min. Pode-se concluir, portanto, que o tratamento empregado para a degradação de contaminantes não resulta necessariamente na remoção e/ou diminuição da toxicidade da solução.

Klamerth *et al.*<sup>105</sup> avaliaram a toxicidade aguda para *V. fischeri* de um efluente real contendo 15 contaminantes (inclusive flumequina e ofloxacina) e concluíram que, após a aplicação do processo foto-Fenton, apesar da concentração desses compostos ter diminuído, a toxicidade da solução aumentou. Por outro lado, Rodrigues-Silva *et al.*<sup>107</sup> não observaram alteração na fluorescência da bactéria *V. fischeri* das amostras de flumequina em água ultrapura submetidas ao processo foto-Fenton. Segundo Backhaus *et al.*,<sup>48</sup> a toxicidade de uma solução de compostos químicos não pode ser atribuída a apenas um dos contaminantes presente na solução, devido ao diferente mecanismo de ação biológica de cada composto. Dessa forma, ensaios de toxicidade em amostras complexas não necessariamente refletem a toxicidade de um composto específico do efluente.

A toxicidade residual pode ser afetada pelo tipo de processo aplicado para a degradação dos contaminantes. Michael *et al.*<sup>114</sup> avaliaram a toxicidade residual (*Daphnia magna*, 48 h) de soluções de ofloxacina submetidas aos processos foto-Fenton (radiação solar) e fotocatálise. Concluíram que a toxicidade da solução aumentou após a aplicação do processo foto-Fenton ao longo do tempo de reação (0 a 60 min). Resultados opostos foram obtidos quando empregada a fotocatálise: a toxicidade da solução diminuiu. Essa diferença pode ser explicada pelos diferentes intermediários formados durante esses dois POA.

Os ensaios de toxicidade aguda fornecem uma informação rápida e preliminar da periculosidade que uma solução pode causar à biota. No entanto, nem sempre esses ensaios

fornecem resultados devido à baixa concentração do contaminante no efluente e a baixa toxicidade das fluoroquinolonas. Concentração efetiva maior que 10 mg  $L^{-1}$  para ensaios crônicos com *Daphnia magna* vem sendo reportada.<sup>57,69,70</sup>

#### 7.3. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das quinolonas está relacionada com a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aceptores (COOH, C=O e F) desses compostos com o DNA-girase das bactérias, resultando na inibição da duplicação dos microrganismos. O DNA-girase é uma enzima que evita o emaranhamento da fita de DNA da bactéria durante e após sua duplicação. Ao inibir essa enzima, ocorre uma síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias.<sup>134</sup>

Caso ocorram alterações nos sítios da molécula da quinolona, onde se formam as ligações de hidrogênio, espera-se que a atividade antimicrobiana diminua. As reações entre os radicais hidroxila e as quinolonas não são facilmente identificáveis, uma vez que o radical hidroxila não é seletivo, podendo entrar em contato com qualquer região da molécula alvo.

São raros os dados na literatura sobre a atividade antimicrobiana de soluções que foram submetidas a um POA.<sup>76-78,95-96,106-107,135</sup> Destaca-se que essa avaliação é de fundamental importância, uma vez que, mesmo o composto sendo altamente degradado, os intermediários formados podem apresentar atividade biológica. Com os ensaios de atividade antimicrobiana, é possível prever possíveis impactos no meio ambiente.

Nos trabalhos de Mansilla *et al.*,<sup>76</sup> Palominos *et al.*<sup>77</sup> e Giraldo *et al.*<sup>95</sup> foi avaliada a atividade antimicrobiana baseando-se na medida do halo de inibição formado no filme de ágar de uma placa de Petri inoculada com *E. coli*. Porém, os resultados desses estudos podem ser considerados apenas qualitativos ou semi-quantitativos para a avaliação da atividade

antimicrobiana residual de uma solução, visto que esta avaliação não ocorre pela contagem de microrganismos na solução.

Dodd *et al.*,<sup>135</sup> Paul *et al.*,<sup>96</sup> Da Silva *et al.*<sup>78</sup> e Rodrigues-Silva *et al.*<sup>106-107</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana residual de soluções de quinolonas submetidas aos POA por ensaios de inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli*. As soluções iniciais e as soluções submetidas aos processos de degradação foram serialmente diluídas e expostas a uma concentração definida de microrganismos. Nesses estudos, os autores concluíram que a atividade antimicrobiana da solução decaiu conforme a quinolona foi degradada. Porém, é importante salientar ainda que esses estudos foram realizados apenas para ciprofloxacina, enrofloxacina e flumequina e em água ultrapura.

É possível que a desativação da atividade antimicrobiana ocorra mesmo quando não seja alcançada a total mineralização do composto alvo presente na solução. No trabalho de Paul *et al.*,<sup>96</sup> a atividade antimicrobiana da solução de ciprofloxacina foi reduzida após a mesma ser submetida ao processo de fotocatálise, mesmo quando o núcleo da quinolona permaneceu intacto. Portanto, pode ser considerado eficiente os tratamentos que desativem a atividade biológica ou que modifiquem a estrutura dos antimicrobianos.<sup>96</sup>

Da Silva *et al.*<sup>78</sup> avaliaram a remoção da atividade antimicrobiana de uma solução de flumequina submetida aos processos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV<sub>254nm</sub> e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O processo oxidativo avançado foi capaz de remover totalmente a atividade antimicrobiana da solução em apenas 30 min, enquanto que para a fotólise, foram necessários 60 min de ensaio. Por fim, os ensaios com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não resultaram na diminuição da atividade antimicrobiana da solução. Rodrigues-Silva *et al.*<sup>107</sup> observaram que o processo foto-Fenton foi eficaz na remoção da atividade antimicrobiana da solução: em apenas 15 min, a mesma foi completamente removida. Similar eficiência foi atingida utilizando o processo de fotocatálise com TiO<sub>2</sub> em suspensão.<sup>106</sup> Além disso, Rodrigues-Silva *et al.*<sup>107</sup> constataram que os produtos formados deveriam apresentar baixa atividade antimicrobiana devido às modificações no sítio de ligação com o DNA-girase. Esses estudos demonstraram a eficácia dos POA na desativação da atividade antimicrobiana de soluções contendo flumequina.

## 8. CONCLUSÕES

Os métodos analíticos de detecção disponíveis permitem a quantificação das quinolonas em matrizes aquosas na ordem de  $\mu$ g L<sup>-1</sup> a ng L<sup>-1</sup>. Destaca-se a presença desses contaminantes emergentes na ordem de ng L<sup>-1</sup> em água destinada ao abastecimento público. Os processos convencionais de tratamento de águas e efluentes não são completamente eficientes na degradação desses compostos.

Vários processos oxidativos avançados foram avaliados e mostraram ser eficientes na degradação das quinolonas. No entanto, muitos trabalhos ainda utilizam uma concentração inicial do analito bastante alta (ordem de mg  $L^{-1}$ ) quando comparada com a concentração encontrada nas matrizes aquosas ambientais.

Apenas alguns trabalhos publicados abordaram ensaios ecotoxicológicos. Nesses trabalhos, a toxicidade residual das soluções foi avaliada utilizando apenas um organismo teste. A toxicidade das quinolonas pode ser considerada baixa para a maioria dos organismos utilizados, tornando também de fundamental importância a avaliação da atividade biológica das soluções submetidas aos processos de degradação, ou seja, no caso das quinolonas, da atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

1. Kemper, N.; Ecol. Ind. 2008, 8, 1.

- 2. Hernando, M. D.; Mezcua, M.; Fernández-Alba, A. R.; Barceló, D.; Talanta 2006, 69, 334.
- 3. Cisneros-Farrar, F.; Parsons, L. C.; Crit. Care Nurs. Clin. N. Am. 207, 19, 43.
- 4. Andriole, V. T.; Clin. Infect. Dis. 2005, 41, S113.
- 5. Bolon, M. K.; Infect. Dis. Clin. N. Am. 2009, 23, 1027.
- 6. Owens, R. C.; Ambrose, P. G.; Clin. Infect. Dis. 2005, 41, S144.
- 7. King, D. E.; Malone, R.; Lilley, S. H.; Am. Fam. Physician 2000, 9, 2741.
- 8. Ball, P.; The Quinolones, 3<sup>th</sup> ed., Academic Press: United Kingdom, 2000.
- 9. Xiao, Y.; Chang, H.; Jia, A.; Hu, J.; J. Chromatogr. A 2008, 1214, 100.
- 10. Regitano, J. B.; Leal, R. M.; R. Bras. Ci. Solo 2010, 34, 601.
- 11. Lai, H-T.; Lin, J-J.; Chemosphere 2009, 75, 462.
- 12. Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D.; Aquat. Toxicol. 2006, 76, 122.
- 13. Nieto, J.; Freer, J.; Contreras, D.; Candal, R. J.; Sileo, E. E.; Mansilla, H. D.; *J. Hazard. Mater.* **2008**, 155, 45.
- 14. Wang, P.; He, Y-L.; Huang, C-H.; Water Res. 2010, 44, 5989.
- 15. Diaz-Cruz, M. S.; Alda, M. J. L.; Barceló, D.; Trends Anal. Chem. 2003, 22, 340.
- 16. Kümmerer, K.; Chemosphere 2009, 75, 417.
- 17. Andreu, V.; Blasco, C.; Pico, Y.; Trends Anal. Chem. 2007, 26, 534.
- 18. http://www.ibge.gov.br, acessada em Janeiro 2013.
- http://www.ahi.org/files/Media/Center/Antibiotic/Use/202007.pdf, acessada em Fevereiro 2013.
- 20. Tamtam, F.; Mercier, F.; Le Bot, B.; Eurin, J.; Dinh, Q.T.; Clément, M.; Chevreuil, M.; Sci. *Total Environ.* **2008**, 393, 84.
- 21. Garcia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F.; J. Chromatogr. A 2011, 1218, 2264.
- 22. Dorival-García, N.; Zafra-Gómez, A.; Cantarero, S.; Navalón, A.; Vílchez, J. L.; *Microchem. J.* **2013**, 106, 323.
- 23. Lin, A. Y-C.; Yu, T-H.; Lateef, S. K.; J. Hazard. Mater. 2009, 167, 1163.
- 24. Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D.; *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 2711.
- 25. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Anal. Chem 2007, 79, 1135.
- 26. Jia, A.; Wan, Y.; Xiao, Y.; Hu, J.; Water Res. 2012, 46, 387.
- 27. Tong, L.; Li, P.; Wang, Y.; Zhu, K.; Chemosphere 2009, 74, 1090.
- 28. Hu, X.; Zhou, Q.; Luo, Y.; Environ. Pollut. 2010, 158, 2992.
- 29. Feitosa-Felizzola, J.; Chiron, S.; J. Hydrol. 2009, 364, 50.
- 30. Massey, L. B.; Haggard, B. E.; Galloway, J. M.; Loftin, K. A.; Meyer, M. T.; Green, W. R.; *Ecol. Eng.* **2010**, 36, 930.
- 31. Li, W.; Shi, Y.; Gao, L.; Liu, J.; Cai, Y.; Chemosphere 2012, 89, 1307.
- Yiruhan; Wang, Q-J.; Mo, C-H.; Li, Y-W.; Gao, P.; Tai, Y-P.; Zhang, Y.; Ruan, Z-L.; Xu, J-W.; *Environ. Pollut.* 2010, 158, 2350.
- 33. Chang, X.; Meyer, M. T.; Liu, X.; Zhao, Q.; Chen, H.; Chen, J.; Qiu, Z.; Yang, L.; Cao, J.; Shu, W.; *Environ. Pollut.* 2010, 158, 1444.
- 34. Kolpin, D.; Furlong, E.; Meyer, M.; Thurman, E. M.; Zaugg, S.; *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1202.
- 35. Muñoz, I.; Gómez, M. J.; Molina-Díaz, A.; Huijbregts, M. A. J.; Fernández-Alba, A. R.; García-Calvo, E.; *Chemosphere* **2008**, 74, 37.
- 36. Golet, E. M.; Alder, A. C.; Hartmann, A.; Ternes, T. A.; Giger, W.; Anal. Chem. 2001, 73, 3632.
- 37. Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P.; Chemosphere 2003, 50, 1319.

- 38. Nakata, H. Kannan, K.; Jones, P.D.; Giesy, J.P.; Chemosphere 2005, 58, 759.
- 39. Karthikeyan, K. G.; Meyer, M. T.; Sci. Total Environ. 2006, 361, 196.
- 40. Batt, A. L.; Kim, S.; Aga, D. S.; Chemosphere 2007, 68, 428.
- 41. Brown, K. D.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T. H.; Mawhinney, D. B.; *Sci. Total Environ.* **2006**, 366, 772.
- Duong, H. A.; Pham, N. H.; Nguyen, H. T.; Hoang, T. T.; Pham, H. V.; Pham, V. C.; Berg, M.; Giger, W.; Alder, A. C.; *Chemosphere* 2008, 72, 968.
- 43. Ma, F.; Yuan, G.; Meng, L.; Oda, Y.; Hu, J.; Chemosphere 2012, 88, 476.
- 44. Gulkowska, A.; Leung, H. W.; So, M. K.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.; Yeung, L. W. Y.; Richardson, B. J.; Lei, A. P.; Giesy, J. P.; Lam, P. K. S.; *Water Res.* **2008**, 42, 395.
- 45. Tamtam, F.; Van Oort, F.; Le Bot, B.; Dinh, T.; Mompelat, S.; Chevreuil, M.; Lamy, I.; Thiry, M.; *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 540.
- 46. Xie, Y.; Li, X-W.; Wang, J-F.; Christakos, G.; Hu, M-G.; An, L-H.; Li, F-S.; *Sci. Total Environ.* **2012**, 430, 126.
- 47. Karci, A.; Balcioglu, I. A.; Sci. Total Environ. 2009, 407, 4652.
- 48. Backhaus, T.; Scholze, M.; Grimme, L. H.; Aquat. Toxicol. 2000, 49, 49.
- 49. Reyes, C.; Fernández, J.; Freer, J.; Mondaca, M. A.; Zaror, C.; Malato, S.; Mansilla, H. D.; J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2006, 184, 141.
- 50. Bila, D. M.; Dezotti, M.; Quim. Nova 2003, 26, 523.
- 51. Nagulapally, S. R.; Ahmad, A.; Henry, A.; Marchin, G. L.; Zurek, L.; Bhandari, A.; Water Environ. Res. 2009, 81, 82.
- Szczepanowski, R.; Linke, B.; Krahn, I.; Gartemann, K-H.; Gützkow, T.; Eichler, W.; Pühler, A.; Schlüter, A.; *Microbiology* 2009, 155, 2306.
- 53. Al-Ahmad, A.; Haiss, A.; Unger, J.; Brunswick-Tietze, A.; Wiethan, J.; Kümmerrer, K.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 57, 264.
- 54. Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Mercsch-Sundermann, V.; Chemosphere 2000, 40, 701.
- 55. Vieno, N. M.; Härkki, H.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L.; Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 5077.
- 56. Gao, L.; Shi, Y.; Li, W.; Niu, H.; Liu, J.; Cai, Y.; Chemosphere 2012, 86, 665.
- 57. Hernando, M. D.; De Vettori, S.; Martínez Bueno, M. J.; Fernández-Alba, A. R.; *Chemosphere* 2007, 68, 724.
- 58. Dodd, M. C.; Shah, A. D.; Von Gunten, U.; Huang, C-H.; *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39, 7065.
- 59. Najjar, N. H.; Deborde, M.; Journel, R.; Vel Leitner, N. K.; Water Res. 2013, 47, 121.
- 60. http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/30004S7Z.pdf, acessada em Março 2013.
- 61. Paul, T.; Miller, P. L.; Strathmann, T. J.; Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 4720.
- 62. Neugebauer, U.; Szeghalmi, A.; Schmitt, M.; Kiefer, W.; Popp, J.; Holzgrabe, U.; Spectrochim. Acta Part A 2005, 61, 1505.
- 63. Sirtori, C.; Zapata, A.; Gernjak, W.; Malato, A.; Agüera, A.; Chemosphere 2012, 88, 627.
- 64. Pouliquen, H.; Delépée, R.; Larhantec-Verdier, M.; Morvan, M.; Le Bris, H.; Aquaculture 2007, 262, 23.
- 65. Prabhakaran, D.; Sukul, P.; Lamshöft, M.; Maheswari, M. A.; Zühlke, S.; Spiteller, M.; *Chemosphere* **2009**, 77, 739.
- 66. Kusari, S.; Prabhakaran, D.; Lamshöft, M.; Spiteller, M.; Environ. Pollut. 2009, 157, 2722.
- 67. Vasconcelos, T. G.; Kümmerer, K.; Henriques, D. M.; Martins, A. F.; *J. Hazard. Mater.* **2009**, 169, 1154.
- 68. Sturini, M.; Speltini, A.; Maraschi, F.; Profumo, A.; Pretali, L.; Fasani, E.; Profumo, A.; Pretali, L.; Fasani, E.; Albini, A.; *Chemosphere* **2012**, 86, 130.

- 69. Wammer, K. H.; Korte, A. R.; Lundeen, R.A.; Sundberg, J. E.; McNeill, K.; Arnold, W.; *Water Res.* 2013, 47, 439.
- 70. Hapeshi, E.; Achilleos, A.; Vasquez, M. I.; Michael, C.; Xekoukoulotakis, N. P.; Mantzavinos, D.; Kassinos, D.; *Water Res.* **2010**, 44, 1737.
- 71. Hidalgo, M. E.; Pessoa, C.; Fernandez, E.; Cárdenas, A. M.; J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 1993, 73, 135.
- 72. Pollice, A.; Laera, G.; Cassano, D.; Diomede, S.; Pinto, A.; Lopez, A.; Mascolo, G.; *J. Hazard. Mater.* **2012**, 203–204, 46.
- 73. Sturini, M.; Speltini, A.; Maraschi, F.; Pretali, L.; Profumo, A.; Fasani, E.; Albini, A.; Migliavacca, R.; Nucleo, E.; *Water Res.* 2012, 46, 5575.
- 74. De la Cruz, N.; Giménez, J.; Esplugas, S.; Grandjean, D.; Alencastro, L. F.; Pulgarín, C.; *Water Res.* 2012, 46, 1947.
- 75. Li, Y.; Niu, J.; Wang, W.; Chemosphere 2011, 85, 892.
- 76. Mansilla, H. D.; Mora, A.; Pincheira, C.; Mondaca, M. A.; Marcato, P. D.; Durán, N.; Freer, J.; Appl. Catal. B 2007, 76, 57.
- 77. Palominos, R.; Freer, J.; Mondaca, M. A.; Mansilla, H. D.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2008**, 193, 139.
- 78. Da Silva, C. R.; Maniero, M. G.; Rath, S.; Guimarães, J. R.; *J. Adv. Oxid. Technol.* **2011**, 14, 106.
- 79. Klamerth, N.; Malato, S.; Maldonado, M. I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.; *Catal. Today* **2011**, 161, 241.
- 80. Guo, W.; Shi, Y.; Wang, H.; Yang, H.; Zhang G.; Ultrason. Sonochem. 2010, 17, 680.
- 81. De Vries, H.; Van Henegouwen, G. M. J. B.; J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2000, 58, 6.
- 82. Rivas, J.; Gimeno, O.; Borralho, T.; Carbajo, M.; J. Hazard. Mater. 2010, 174, 393.
- 83. Haque, M. M.; Muneer, M.; J. Hazard. Mater. 2007, 145, 51.
- 84. Zhang, J.; Fu, D.; Wu, J.; J. Environ. Sci. 2012, 24, 743.
- 85. Vasquez, M. I.; Garcia-Käufer, M.; Hapeshi, E.; Menz, J.; Kostarelos, K.; Fatta-Kassinos, D.; Kümmerer, K.; *Sci. Total Environ.* **2013**, 450, 356.
- 86. Rosal, R.; Rodríguez, A.; Perdigón-Melón, J. A.; Petre, A.; García-Calvo, E.; Gómez, M. J.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A. R.; *Water Res.* **2010**, 44, 578.
- 87. Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira, R. F. P.; Quim. Nova 2009, 32, 188.
- 88. Nogueira, R. F. P.; Trovó, A. G.; Silva, M. R.; Villa, R. D.; Quim. Nova 2007, 30, 400.
- Paleologou, A.; Marakas, H.; Xekoukoulotakis, N. P.; Moya, A.; Vergara, Y.; Kalogerakis, N.; Gikas, P.; Mantzavinos, D.; *Catal. Today* 2007, 129, 136.
- 90. Guimarães, J. R.; Gasparini, M. C.; Maniero, M. G.; Mendes, C. G. N.; J. Braz. Chem. Soc. 2012, 23, 1680.
- 91. Guimarães, J. R.; Maniero, M. G.; de Araújo, R. N.; J. Environm. Manage. 2012, 110, 33.
- 92. Mazille, F.; Lopez, A.; Pulgarin, C.; Appl. Catal. B 2009, 90, 321.
- 93. Sirtori, C.; Zapata, A.; Gernjak, W.; Malato, S.; Lopez, A.; Agüera, A.; *Water Res.* 2011, 45, 1736.
- 94. Kim, I.; Yamashita, N.; Tanaka H.; J. Hazard. Mater. 2009, 166, 1134.
- 95. Giraldo, A. L.; Penuela, G. A.; Torres-Palma, R. A.; Pino, N. J.; Palominos, R. A.; Mansilla, H. D.; *Water Res.* 2010, 44, 5158.
- 96. Paul, T.; Dodd, M. C.; Strathmann, T. J.; Water Res. 2010, 44, 3121.
- 97. An, T.; Yang, H.; Li, G.; Song, W.; Cooper, W. J.; Nie, X. Appl. Catal. B 2010, 94, 288.
- 98. Klamerth, N.; Malato, S.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.; Water Res. 2013, 47, 833.

- Perini, J. A. L.; Perez-Moya, M.; Nogueira, R. F. P.; J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2013, 259, 53.
- 100. Van Doorslaer, X.; Demeestere, K.; Heynderickx, P. M.; Van Langenhove, H.; Dewulf J.; *Appl. Catal. B* **2011**, 101, 540.
- 101. Guinea, E.; Garrido, J. A.; Rodríguez, R. M.; Cabot, P.; Arias, C.; Centellas, F.; Brillas, E.; *Electrochim. Acta* 2010, 55, 2101.
- 102. Bernabeu, A.; Vercher, R. F.; Santos-Juanes, L.; Simón, P. J.; Lardín, C.; Martínez, M. A.; Vicente, J. A.; González, R.; Llosá, C.; Arques, A.; Amat, A. M.; *Catal. Today* 2011, 161, 235.
- 103. Sirtori, C.; Zapata, A.; Malato, S.; Gernjak, W.; Fernández-Alba, A. R.; Agüera, A.; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 644.
- 104. Miranda-García, N.; Suárez, S.; Sánchez, B.; Coronado, J. M.; Malato, S.; Maldonado, M. I.; *Appl. Catal. B* **2011**, 103, 294.
- 105. Klamerth, N.; Rizzo, L.; Malato, S.; Maldonado, M. I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A. R.; *Water Res.* 2010, 44, 545.
- 106. Rodrigues-Silva, C.; Maniero, M. G.; Rath, S.; Guimarães, J. R.; Chem. Eng. J. 2013, 224, 46.
- 107. Rodrigues-Silva, C.; Maniero, M. G.; Rath, S.; Guimarães, J. R.; *Sci. Total Environ.* 2013, 445-446, 337.
- 108. De Witte, B.; Langenhove, H. V.; Hemelsoet, K.; Demeestere, K.; Wispelaere, P. D.; Speybroeck, V. V.; Dewulf, J.; *Chemosphere* 2009, 76, 683.
- 109. Van der Weeën, P.; Baetens, J. M.; Verwaeren, J.; Van Doorslaer, X.; Heynderickx, P. M.; Dewulf, J.; De Baets, B.; *Chem. Eng. J.* **2012**, 188, 181.
- 110. Van Doorslaer, X.; Heynderickx, P. M.; Demeestere, K.; Debevere, K.; Van Langenhove, H.; Dewulf, J.; *Appl. Catal. B* **2012**, 111–112, 150.
- 111. Chen, M.; Chu, W.; J. Hazard. Mater. 2012, 219-220, 183.
- 112. Sousa, M. A.; Gonçalves, C.; Vilar, V. J. P.; Boaventura, R. A. R.; Alpendurada, M. F.; *Chem. Eng. J.* **2012**, 198–199, 301.
- 113. Rivas, F. J.; Beltrán, F. J.; Encinas, A.; J. Environ. Manage. 2012, 100, 10.
- 114. Michael, I.; Hapeshi, E.; Michael, C.; Fatta-Kassinos, D.; Water Res. 2010, 44, 5450.
- 115. Prieto-Rodriguez, L.; Miralles-Cuevas, S.; Oller, I.; Agüera, A.; Puma, G. L.; Malato, S.; *J. Hazard. Mater.* **2012**, 211–212, 131.
- 116. Michael, I.; Hapeshi, E.; Michael, C.; Varela, A. R.; Kyriakou, S.; Manaia, C. M.; Fatta-Kassinos, D.; *Water Res.* 2012, 46, 5621.
- 117. Miralles-Cuevas, S.; Arqués, A.; Maldonado, M. I.; Sánchez-Pérez, J. A.; Rodríguez, S. M.; *Chem. Eng. J.* **2013**, 224, 89.
- 118. Rozas, O.; Contreras, D.; Mondaca, M. A.; Pérez-Moya, M.; Mansilla, H. D.; *J. Hazard. Mater.* **2010**, 177, 1025.
- 119. De Arruda, T. L.; Jardim, W. F.; Quim. Nova 2007, 30, 1628.
- 120. Méndez-Arriaga, F.; Esplugas, S.; Giménez, J.; Water Res. 2010, 44, 589.
- 121. Hameed, B. H.; Lee, T. W.; J. Hazard. Mater. 2009, 164, 468.
- 122. De Santana, H.; Bonancêa, C. E.; Takashima, K.; Quim. Nova 2003, 26, 807.
- 123. Malato, S.; Fernández- Ibáñez, P.; Maldonado, M. I.; Blanco, J.; Gernjak, W.; *Catal. Today* **2009**, 147, 1.
- 124. Hu, L.; Flanders, P. M.; Miller, P. L.; Strathmann, T. J.; Water Res. 2007, 41, 2612.
- 125. Almeida, E.; Assalin, M. R.; Rosa, M. A.; Duran, N.; Quim. Nova 2004, 27, 818.
- 126. von Gunten, U.; Water Res. 2003, 37, 1443.

- 127. Balcioglu, I. A.; Otker, M.; Turkish J. Eng. Env. Sci. 2004, 28, 325.
- 128. Pretali, L.; Fasani, E.; Dondi, D.; Mella, M.; Albini, A.; Tetrahedron Lett. 2010, 51, 4696.
- 129. Sturini, M.; Speltini, A.; Maraschi, F.; Pretali, L.; Profumo, A.; Irastorza, E. A.; Fasani, E.; Albini, A.; *Appl. Catal. B* **2012**, 119–120, 32.
- 130. Babic, S.; Perisa, M.; Skoric, I.; Chemosphere 2013, 91, 1635.
- 131. Hoffmann, E.; Stroobant, V.; Mass Spectrometry Principles and Applications, 3<sup>th</sup> ed., Wiley: England, 2007.
- 132. Albini, A.; Monti, S.; Chem. Soc. Rev. 2003, 32, 238.
- 133. Liu, C.; Nanaboina; V.; Korshin, G. V.; Jiang, W.; Water Res. 2012, 46, 5235.
- 134. Scholar, E. M.; Am. J. Pharm. Educ. 2002, 66, 164.
- 135. Dodd, M. C.; Kohler, H. P. E.; von Gunten, U.; Environ. Sci. Technol. 2009, 43, 2498.
## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 4.1 Degradação de flumequina por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Artigo "Antibacterial Activity Inhibition after the Degradation of Flumequine by  $UV/H_2O_2$ " publicado na revista Journal of Advanced Oxidation Technologies, volume 14, número 1, páginas 106 a 114, no ano de 2011. Este artigo corresponde as páginas 50 a 58 desta tese.

## Antibacterial Activity Inhibition after the Degradation of Flumequine by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Caio Rodrigues da Silva<sup>1</sup>, Milena Guedes Maniero<sup>1</sup>, Susanne Rath<sup>2</sup>, and José Roberto Guimarães<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Civil Engineering, Architecture and Urban Design School, University of Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6021, 13083-852 - Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Chemistry Institute, University of Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6154, 13084-971 – Campinas, SP, Brazil

#### Abstract:

Flumequine is a broad-spectrum antibacterial agent of the quinolone class widely used as veterinary drug in food-producing animals. It is considered as pseudo-persistent compound continuously introduced into the environment and its presence in the environment may contribute to the development of drug resistant bacterial strains. In this study antibacterial activity removal during flumequine degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was evaluated. The results showed that the advanced oxidation processes (AOPs) using  $UV/H_2O_2$  was effective in removing the antibacterial activity of flumequine in aqueous solution. The dose-response dropped as the AOP removed flumequine from the solution during the treatment. After 15 minutes, the log dilution rose from -1.0 to -0.18 to achieve the antibacterial veterinary drug EC<sub>50</sub>. Moreover, after 30 minutes it was untraceable, which indicates flumequine degradation through AOP, as confirmed by quantitative HPLC analyses (degradation higher than 99%). It was also shown that the by-products formed during the oxidation did not offer stronger antibacterial activity. These results showed that AOP is technically efficient for the treatment of aqueous solutions containing flumequine.

**Keywords:** Flumequine, antibacterial activity, degradation, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Introduction

Antimicrobials are veterinary drugs widely used in food producing animals, primarily for therapy, prophylaxis, infection control (metaphylaxis) and growth promotion purposes. After administration, they are usually not fully metabolized due to the low absorption of the antimicrobials in the animal's digestive system. Thus, the antimicrobials may be eliminated in natura through urine and feces, being excreted both nonmetabolized and as active metabolites (1), which are discarded into the receiving water and soil. The presence of veterinary drugs in aquatic environments has concerned the scientific community in European countries (2), and thus should claim attention in Brazil, where the livestock population surpasses that of the human beings (IBGE - Brazilian Institute of Geography and Statistics).

Veterinary drugs represent real risks for the environment, due to their persistence. With large use in animal husbandry, they are introduced directly into the environment, and so, even in low concentrations, may cause synergic effects (3). In addition, concerns about the occurrence of antimicrobials in the environment have been growing due to the potential evolution of antibiotic resistant bacteria (4).

Flumequine is a broad-spectrum synthetic antibacterial agent of the quinolone class, especially active against gram-positive bacteria, widely used as a veterinary drug in food-producing animals. Its primary target is the bacterial enzyme DNA gyrase (or topoisomerase II), which renders the DNA molecule compact and biologically active, with the subsequent blocking of bacterial multiplication (5). Flumequine is administered orally to various animal species, and it is mainly used for treatment of enteric infections (6). Involuntary dietary consumption of antibiotics alters the normal flora, contributing to increased susceptibility to bacterial infections. Moreover, antibiotics can also generate allergy and toxicity and favor the development of antibiotic resistance bacteria (7).

Flumequine residues often occur in aquatic environments, but little is known about their fates. This knowledge is necessary for proper risk assessment and management for both humans and the environment (8).

Antimicrobials, including flumequine, usually are not degraded or easily removed by conventional water treatment systems, a fact that limits its removal options. Nevertheless, treatment using advanced oxidation processes (AOPs) has been reported as a possible method to remove veterinary drugs from water (7). The

<sup>\*</sup>Corresponding author; E-mail address: jorober@fec.unicamp.br

<sup>106</sup> J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011

ISSN 1203-8407 © 2011 Science & Technology Network, Inc.

AOP can be defined as a process based on hydroxyl radical formation ('OH), and with strong capability to mineralize organic compounds because of its high oxidation potential (E = 2.730 V) (9).

It is important to highlight the unavailability of research related to the degradation of flumequine by peroxidation assisted by ultraviolet light. Palominos et al. (7) analyzed the degradation of this quinolone by the AOP photocatalytic oxidation carried out on aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions assisted by simulated solar light. Total depletion was reached after 30 minutes and 80% of flumequine mineralized after 60 minutes of reaction. Nieto et al. (10) treated aqueous solutions with photocatalytic oxidation through titanium dioxide, in its pure form (TiO<sub>2</sub>), and in the presence of urea (u-TiO<sub>2</sub>) and of thiourea (t-TiO<sub>2</sub>), prepared using the solgel technique, achieving 55, 90 and 90% of degradation respectively, after 15 minutes of treatment.

The UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spawns hydroxyl radicals when two very popular processes are combined: one physical (UV radiation) and other oxidative (peroxidation). The generation of hydroxyl radical excels amongst the other oxidation processes due to its capability for disinfection (11), color removal (12), and destruction of organic contaminants in water (13a). Hydroxyl radical generation in the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process is shown in reaction 1.

$$H_2O_2 + hv \rightarrow 2^{\circ}OH$$
 Reaction (1)

The degradation of pharmaceutical compounds used in the syntheses of the antibiotic cefazolin by photolysis and by AOP (UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was evaluated by Lopez et al. (14), who verified the superior efficiency of the AOP, since cefazolin compounds were degraded in less time than when only photolysis was applied. Vogna et al. (15) used UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in their studies and verified the process was efficient in the degradation of carbazepine; UV-light by itself was not capable of removing the drug from experimental samples in solution. In the research of Kim et al. (13b) the maximum radiation dose applied to the degradation of 90% of solubilized drugs and personal care products in aqueous solution was 5644 mJ cm<sup>-2</sup>. Furthermore, the addition of  $H_2O_2$  during the treatment by photolysis resulted in a significant increase of the compound removal percentage with less time of treatment exposure.

However, in addition to drug removal, it should be assured that the antibacterial activity is also removed, since some reaction products may also be active. Antibacterial activity inhibition analyses provide information about microorganism behavior when in contact with residual compounds and by-products of an oxidative process. Thus, it is possible to suppose its impacts in the environment. Moreover, this assay can provide complementary information to confirm a superior efficiency of an oxidative or advanced oxidative process. Palominos et al. (7) evaluated antibacterial activity by seeding *Escherichia coli* in agar with irradiated samples and Paul et al. (16) and Dodd et al. (17) used the microdilution technique to determine the dose-response of the irradiated solution in *E. coli* culture compared with a standard. In this study the toxicities of the treated solutions were analyzed by microdilution assays.

The purpose of the present study is to evaluate antibacterial activity removal during flumequine degradation, in aqueous solution, by photolysis (UV), peroxidation ( $H_2O_2$ ) and peroxidation assisted by UV light (UV/ $H_2O_2$ ). Moreover, quantification of flumequine (i.e. treated and standard solutions), spectra in the UV-visible region and hydrogen peroxide concentrations were also evaluated.

## Experimental

#### Chemicals

Flumequine (99%) was supplied by Sigma-Aldrich, methanol (HPLC grade) and BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (99%) by J. T. Baker, oxalic acid (99.5%) by Merck, hydrogen peroxide (30%, v/v) and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> by Synth, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%) by Nuclear, KOH (85%) by Ecibra and NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> (99%) by Riedel-de Haën. Mueller-Hinton broth cultures were supplied by Himidia and agar by Biobrás. Milli-Q water was obtained through a Milli-Q Academic water purification system (Millipore) and used throughout the studies.

#### **Stock Solution**

The stock solution of flumequine was prepared at 250 mg  $L^{-1}$  in methanol and stored at 4 °C, protected from light. Flumequine working solutions (500 µg  $L^{-1}$ ) for peroxidation, photolysis and peroxidation assisted by UV light were prepared by dilution of the stock solution with water. The chemical structure of flumequine is shown in Figure 1.

#### Experimental Set-up

The degradation assays were carried out in a borosilicate glass reactor (190 mL), with 3.6 cm inner diameter and 42.0 cm length with a concentric low pressure mercury lamp (15 W,  $\lambda_{max} = 254$  nm and 2.1 cm indoor diameter).

Figure 2 shows the experimental system constituted of a reactor, a magnetic stirrer, a 1000 mL reservoir and a peristaltic pump (for solution recirculation). The



Figure 1. Chemical structure of flumequine.



Figure 2. Experimental system used in the degradation studies: 1– magnetic stirrer, 2– reservoir, 3– peristaltic pump and 4– photochemical reactor.

flow applied in the experiments was around 100 mL min<sup>-1</sup>. A similar experimental system was used by Nogueira and Guimarães (18) and Guimarães and Barreto (19) with satisfactory results for the degradation of dichlorophenol and *Clostridium perfringens*.

The radiation intensity emitted from the UV-lamp of 8.3 mW cm<sup>-2</sup> was measured through a Cole Parmer (VLX 3 W model) radiometer, previously calibrated at 254 nm. It is worth emphasizing that the time shown on the *x*-axis of the plots represents the total time, which differs from the irradiation time, since the volumes of the reactor (190 mL) and the solution (1000 mL) (i.e. solution under treatment) are not the same. The irradiation time was calculated according to equation 1.

$$t_{irradiatio n} = t_{reaction} \times \frac{V_{reactor}}{V_{total}}$$
 Equation (1)

where  $t_{irradiation}$  is the exposition time,  $t_{reaction}$  is the reaction time,  $V_{reactor}$  and  $V_{solution}$  represent the reactor volume and sample volume, respectively.

The radiation dose (W s cm<sup>-2</sup>) was measured as the product of radiation intensity (W cm<sup>-2</sup>) by exposition time (s), according to equation 2.

$$D = I \times t_{irradiatio}$$
 Equation (2)

**108** J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011

where D is related to the UV radiation dose, I represents the radiation intensity and t the exposition time.

The reaction time analyzed for the photolysis, peroxidation and  $UV/H_2O_2$  were between 0 to 60 minutes. The hydrogen peroxide concentration varied from 0.5 to 4 mmol L<sup>-1</sup>. All tests were performed with the flumequine working solution without pH correction (around pH 7).

The percentage of degradation was calculated by using equation (3):

Degradatio 
$$n(\%) = \frac{[C_0] - [C]}{C_0} \times 100$$
 Equation (3)

in which,  $[C_0]$  is the initial flumequine concentration and [C] is the flumequine concentration after the degradation process.

#### Analytical Methods

Flumequine degradation was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. Sample preparation prior to the quantification was done by solid phase extraction (SPE).

The SPE was carried out using a C<sub>18</sub> solid phase cartridge (Varian 500 mg/6 mL), previously conditioned with methanol (6 mL) and water (6 mL). One liter of sample was percolated through the cartridges at a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup>. Subsequently, the sorbent was dried under vacuum and the analyte was eluted with methanol (4 mL). The eluate was filtered (0.22  $\mu$ m membrane filters) before HPLC-analyses. The recovery ranged from 89 to 104% for samples containing flumequine in the concentration range of 50 to 500 µg L<sup>-1</sup>.

All HPLC analyses were carried out using a Waters chromatographic system equipped with a solvent delivery system, model 510, a Tunable Absorbance Detector, model 486 and a Rheodyne 7725 injector with a sample loop of 20  $\mu$ L. Quantitation was performed at 236 nm. The analytical column used was an XBridge<sup>®</sup> RP18 from Waters (250 mm × 4.6 mm I.D., 5  $\mu$ m). The mobile phase was methanol and 0.010 mol L<sup>-1</sup> oxalic acid (60:40, v/v). The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

UV-vis-spectra were obtained with a HACH spectrophotometer model DR4000. The initial solution (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of flumequine) and the samples after treatment were analyzed. The spectra were scanned from 200 to 800 nm. The sample was concentrated using the same SPE procedure. After elution with methanol (4 mL) the solution was filtered and diluted 10-fold and subsequently, analyzed at the UV-vis spectrophotometer.

The hydrogen peroxide consumption was evaluated by residual peroxide assay with metavanadate. The vanadate solution, of light yellow color, turns to redorange in the presence of peroxide and a strong absorption band with a maximum at 450 nm is observed, indicating the formation of peroxovanadium cation according to reaction 2 (20).

$$VO^{3-} + H_2O_2 \rightarrow VO_2^{3+} + 3H_2O$$
 Reaction (2)

#### Microbiological Antibacterial Activity Assay

Broth cultures were prepared under sterile conditions by transferring *E. coli* K12 wild type (ATCC: 23716) colonies sampled to thawed Mueller-Hintonglycerol (60:40, v/v) solution into 10 mL of Mueller-Hinton broth and incubated 24 hours at 37 °C on a shaker (100 rpm).

The antibacterial activity inhibition was evaluated with Escherichia coli K12 culture inoculated in Mueller Hinton solution at a population density of  $1.0 \times 10^6$ CFU/mL. The untreated control solution and the treated samples were first diluted 50-fold in 1.0 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 8). Subsequently, ten-member 2:1 serial dilution (i.e., 1.5-fold) series were prepared from each sample across the corresponding row of a 96-well micro titer plate (containing 100 µL of 1 mmol  $L^{-1}$  phosphate buffer, pH 8, in each well) by dosing 300  $\mu$ L of the 50x diluted sample to the first well of the row, then pipetting 200  $\mu$ L of this solution to the next well in the series, and repeating this sequence until all ten dilutions were prepared, and leaving the last well (i.e. 12<sup>th</sup>) only with buffer solution. Each well of the plate was then inoculated with 100 µL of Escherichia coli K12 culture solution, sealed and incubated under 100-rpm agitation for 8 h at 37 °C. After incubation the absorbance of each sample well was measured at 630 nm using a Multiskan MS (series number 352010672) micro plate reader from Labsystems. The antibacterial activities of flumequine standards and treated samples containing flumequine were quantified in duplicate using modified procedures from Paul et al. (16) and Dodd et al. (17).

Absorbance measurements were then converted to growth inhibition (%), *I*, following equation (4):

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$
 Equation (4)

where,  $A_0$  is related to the absorbance of the phosphate buffer incubated with *E. coli* culture and *A* refers the absorbance of the sample incubated in each well, both at 630 nm.

The dilution in each well of the micro plate after the serial dilution was determined by equation (5).



Figure 3. Flumequine degradation by photolysis,  $H_2O_2$  and UV/  $H_2O_2$  ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] initial = 1.0 mmol L<sup>-1</sup>).

$$dilution = \frac{1}{m^n} \qquad \qquad \text{Equation (5)}$$

where m represents the serial dilution factor (i.e. 1.5-fold) and n is related to the number of dilutions.

#### Results and Discussion Degradation Assays

Figure 3 shows the results for flumequine depletion in aqueous solution by photolysis, peroxidation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.0 mmol L<sup>-1</sup> hydrogen peroxide concentration) vs. reaction time. Photolysis was efficient when two times more UV radiation was apllied than with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The chemical process (peroxidation) presented itself as inefficient, even after long time exposure (60 min). The combined chemical and physical process produced the highest flumequine degradation (98%) in aqueous solution after 30 minutes reaction.

Both photolysis and peroxidation processes were evaluated to determine comparative parameters in order to establish the AOPs effectiveness. The photolysis assays proved that just the UV-light provided flumequine degradation, achieving around 80% of flumequine removal after 45 minutes reaction at a radiation dose higher than 4258 mJ cm<sup>-2</sup>. The maximum effective degradation observed through the quantitative HPLC analysis was around 91% with 5677 mJ cm<sup>-2</sup> radiation. These results indicate that a more effective flumequine removal occurs with longer reaction time and higher irradiation doses.

The highest flumequine depletion observed (Figure 3) is due to the radical hydroxyl formation during the AOP (Reaction 1). It is important to highlight that complete flumequine depletion after 30 minutes by the AOP can also be related to simultaneous photolysis. During the AOP, while photolysis promotes the

J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011 109

hydrogen peroxide cleavage, the radiation can also degrade flumequine. It is possible to conclude that the addition of 1.0 mmol  $L^{-1}$  hydrogen peroxide in the AOP was able to produce sufficient radicals to remove the drug from the aqueous solution, saving both energy (2838 mJ cm<sup>-2</sup>) and time (30 minutes) if compared to the simple photolysis treatment.

These results are in agreement with those reported by Lopez *et al.* (14), Vogna *et al.* (15) and Kim *et al.* (13b). In addition, comparing the results available in the literature (7, 10) with the results obtained in this work, using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3), it is possible to conclude that the AOP, by 'OH generated, is an efficient technology to remove flumequine from aqueous solutions.

#### Influence of Hydrogen Peroxide

Peroxidation was evaluated using  $H_2O_2$  in concentrations between 0.5 to 4.0 mmol L<sup>-1</sup> as a control experiment. After 45 minutes, for all  $H_2O_2$  concentrations used, the flumequine removal was less than 10%. Moreover, hydrogen peroxide consumption in the analyses stayed below the detection limit of the employed technique (0.0274 mmol L<sup>-1</sup>). These results indicate low chemical oxidation, i.e., the reaction between  $H_2O_2$  and flumequine was negligible. In fact, this process was not effective in the degradation of flumequine, using  $H_2O_2$  in the evaluated concentration range.

Nevens and Baeyens (21) reported the low performance of peroxidation chemical process for certain classes of refractory contaminants, due to low reaction rates when moderate quantities of  $H_2O_2$  were used. Xu *et al.* (22) reported low degradation of organic composites by peroxidation due to the modest potential of  $H_2O_2$  oxidation, suggesting its use with UV irradiation.

It is worth emphasizing that other studies reported in the literature dealing with peroxidation or UV assisted peroxidation of pharmaceutical, recommend hydrogen peroxide concentrations close to those employed in this research (13b, 22, 23). Thus, due to the low removal rates achieved by peroxidation, it can be concluded that this process is not involved in flumequine degradation.

In the UV assisted peroxidation process (UV/ $H_2O_2$ ) no relevant differences were found among the degradation assays for hydrogen peroxide concentrations varying from 1.0 to 4.0 mmol L<sup>-1</sup> (Figure 4). It was verified that degradation reached 85 and 98% after 15 and 30 min, respectively. Nevertheless, the degradation was lower when an  $H_2O_2$  initial concentration of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> was applied. This indicates





Figure 4. Flumequine degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $[H_2O_2]_{initial} = 0.5$  to 4.0 mmol L<sup>-1</sup>).

that the ideal concentration of hydrogen peroxide to be used for flumequine degradation by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> must be at least 1.0 mmol L<sup>-1</sup>. This H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was sufficient to generate enough hydroxyl radicals to degrade 500  $\mu$ g of this drug in 1000 mL aqueous solution during the AOP.

For the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, different from than for the peroxidation process, there was an oxidant consumption observed during the reaction. This consumption indicates that the hydrogen peroxide was able to absorb the UV light, which promoted the cleavage of the oxygen bond in the peroxide, forming 'OH radicals (Reaction 1). With increases in the initial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (from 1.0 to 4.0 mmol L<sup>-1</sup>), there was an increase in oxidant consumption, promoting an increase in 'OH, the major oxidant agent for advanced oxidative processes. It is possible that the hydrogen peroxide acts as a hydroxyl radical scavenger when an excess of oxidant is present, generating the hydroperoxide radical (HO<sub>2</sub>) (Reaction 3), H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> (Reaction 4) or even the regeneration of the peroxide occurs (Reaction 5) (9, 24). It is important to remark that the hydroperoxide radical has a lower oxidation potential, therefore reducing the degradation process (25). However, for the peroxide concentrations used in these studies, an increase of the rate of flumequine degradation was not observed, as shown in Figure 4.

$$\begin{array}{ll} H_2O_2 + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O + HO_2 {}^{\bullet} & \text{Reaction (3)} \\ HO_2 {}^{\bullet} + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O + O_2 & \text{Reaction (4)} \\ {}^{\bullet}OH + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O_2 & \text{Reaction (5)} \end{array}$$

For the hydrogen peroxide concentration of 1.0 mmol  $L^{-1}$  and reaction time of 10 min (UV dose of 946 mJ cm<sup>-2</sup>), flumequine degradation was higher than 70%. Using this same UV dose (i.e. approximately



Figure 5. Absorbance spectra of the flumequine solutions treated by (A) peroxidation, (B) photolysis and (C) peroxidation assisted by ultraviolet light ( $[H_2O_2]_{initial} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ ).

1000 mJ cm<sup>-2</sup>) and 0.74 mmol L<sup>-1</sup> of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Wu and Linden (26) observed degradation of 70% of parathion, a potent insecticide and acaricide, in solution. Thus, applying similar ultraviolet radiation doses, the degradation obtained in this research was comparable to those obtained by other authors. In conclusion, the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process is effective for the degradation of flumequine.

It should as be noted that during the assays of UVassisted peroxidation there was a solution pH decrease from 7 to close to 4. The kinetics for peroxide consumption was monitored during the assays. Hydrogen peroxide depletion behaves with zero-order kinetics and the consumption reaction rate (k) decreases with its concentration in the treatment system (i.e., -0.003, -0.006, -0.012, -0.025 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> related respectively to: 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mmol L<sup>-1</sup>). It is important to emphasize that in all experiments a residual hydrogen peroxide concentration was observed, indicating that there was no lack of this reagent during the reaction time.

#### **UV-visible Spectrometry**

Absorbance in the wavelength range of 190–300 nm may be representative of conjugated double and triple C–C bonds in a compound and the UV absorption band at 288 nm could be associated with the presence of a phenolic ring (27).

The UV spectrum of flumequine in methanol indicate that this molecule present a maximum absorption at 236 nm and a smaller absorption at 324 nm. Spectrophotometry is only suitable to monitor residual flumequine in solution after previous concentration using SPE. Usually, it is not possible to obtain these spectra from samples containing contaminants at low concentrations (28).

Figure 5.A to 5.C present the UV spectra for the standard (i.e. 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) and treated samples of

flumequine after different degradation processes. A significant difference in the UV-spectra of the samples treated by the AOP was observed. The flumequine solution is colorless and does not present absorption in the visible region. Moreover, the spectra obtained for the samples degraded by hydrogen peroxide did not show any difference (Figure 5.A).

In the studies using photolysis (Figure 5.B) and peroxidation assisted by ultraviolet light (Figure 5.C), there was a significant difference in the spectra of the samples before and after treatment. The  $UV/H_2O_2$ provided a further decrease of some absorbance bands in the range of 200-400 nm in relation to photolysis. For these two processes, it is possible to conclude that flumequine was degraded (supported by HPLC analysis, Figure 3) during the reaction.

#### Antibacterial Activity Test

As shown in Figure 3 (flumequine degradation, evaluated by HPLC analysis), traces of the antibiotic are still present in the solution after the treatment, which indicates incomplete flumequine mineralization. Even residual drug traces in the environment concern the scientific community, due to risks of bacterial resistance development. In order to evaluate possible antibacterial activity, assays were performed on treated samples and compared to standards (i.e untreated samples).

First, the micro plate absorbance results were evaluated by equation (4) and then the growth inhibition percentage of the *E. coli* K12 wild type culture (*I*, as shown in equation 6) vs. the log of the corresponding flumequine concentration serial dilution was plotted, as shown in Figure 6. The dose-response curve, which presents the relationship between the serial dilution and the growth inhibition percentage was evaluated using Richard's equation (16, 17, 29):

J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011 111

$$I(Growthinhibition,\%) = I$$

$$\min_{t} t + \frac{I_{\max, t} - I_{\min, t}}{(1 + 10^{(\log EC_{50} - \log(1/m^{n}) \times H)})^{S}}$$

Equation (6)

where:  $I_{max,t}$  and  $I_{min,t}$  represent the maximum and minimum growth inhibition for each data sample respectively;  $EC_{50}$  is the effective dose (i.e., dilution) at which 50% growth inhibition is achieved; H is the Hill slope for the experimental conditions and S refers to a parameter that quantifies the asymmetry of the dose-response curve slope.

The dose-response curves related to each process applied in flumequine degradation were compared to untreated standards. Figure 6 shows the growth inhibition data corresponding to the samples treated by peroxidation (Figure 6.A), photolysis (Figure 6.B) and peroxidation assisted by UV light (Figure 6.C). All the antibacterial activity assays results were treated using GraphPad Prism (GraphPad software) as suggested by Paul *et al.* (16) and Dodd *et al.* (17). All results are presented with 95% confidence limits as error bars in each graph of antibacterial activity and stoichiometric analysis.

The dose-response dropped as the AOP removed flumequine from the solution over reaction or irradiation time. After 15 minutes the log dilution rose from -1.0 to -0.18 to achieve the antibacterial veterinary drug  $EC_{50}$ ; this means that the treated sample was diluted about 6.66 times less to reach the same  $EC_{50}$  of the original untreated sample. Moreover, after 30 minutes, it was not possible to determine  $EC_{50}$  due to high flumequine degradation through the AOP (more than 99% - determined by HPLC analyses) and the probable absence of by-products with antibacterial activity. This indicates that the dilution of flumequine solution treated by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process needed to achieve the  $EC_{50}$  is reduced, and thus, a less toxic environment is observed in the solution evaluated.

It is possible to relate the dose-response shifts for each sample treated to the flumequine degradation rates. The correlation can be determined as the "potency equivalent" (16) or PEQ value (shown in equation 7).

$$PEQ = \frac{EC_{50,0}}{EC_{50,x}}$$
 Equation (7)

where:  $EC_{500}$  represents the effective dose at which 50% growth inhibition was observed in the untreated flumequine solution and  $EC_{50x}$  is the  $EC_{50}$  value calculated from dose-response data measured for each treated sample.

#### 112 J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011



**Figure 6.** Dose-response relationships for flumequine deactivation by (A) peroxidation, (B) photolysis and (C)  $UV/H_2O_2$  ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>initial</sub> = 1.0 mmol L<sup>-1</sup>). The averages of duplicated experimental measurements are shown with 95% confidence intervals.

The PEQ result can be plotted vs.  $[C]/[C_0]$  to evaluate the quantitative relationship between flumequine depletion in the solution and the corresponding changes in biological activity (16). The ideal flumequine stoichiometry can be seen in Figure 7 as a hypothetical line, where the supposed loss of PEQ per



Figure 7. Correlation between residual flumequine concentration and its antibacterial activity potency in solutions treated by peroxidation, photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

flumequine equivalent molar fraction is shown. Figure 7 also compares the stoichiometry of flumequine deactivation by AOP to the photolysis and peroxidation. As can be verified, AOP was responsible for the total deactivation of the antibacterial activity of the drug after 30 minutes. With just 15 minutes of reaction, the AOP was as statistically effective as 60 minutes of UV irradiation.

Besides, the PEQ value results also indicate that the residual organic compounds are not antibacterial agents. Since none of the evaluated processes resulted in higher antibacterial activity, it is possible to suppose that the treatments applied in this research did not generate compounds with higher toxicity, and so the  $UV/H_2O_2$  was very effective in flumequine removal from aqueous solution and in reducing its antibacterial activity.

These results corrobore with those published by Dodd *et al.* (17), where they confirmed that nearly all of the antibacterial model compounds investigated (which includes fluoroquinolones) by micro dilution assays were also deactivated by 'OH with effective quantitative stoichiometry. Paul *et al.* (16) related superior UVA-TiO<sub>2</sub> photocatalysis capacity to deactivate ciprofloxacin antibacterial activity if compared to visible light-TiO<sub>2</sub> and to photolysis. The hydroxyl radical generation in the AOP resulted in a higher deactivation of the antibacterial agent, which converts into safety for the environment and its surroundings.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from CAPES and FAPESP, and thank Dr.

Márcia Dezotti for supplying *E. coli* and Professor C.H. Collins for language assistance.

#### Conclusion

A significant difference in flumequine degradation by the three evaluated processes was verified. The advanced oxidation process, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was the most efficient, followed by photolysis (UV), while the chemical process of peroxidation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) had the lowest performance, independent of the peroxide concentration used (0.5 - 4 mmol L<sup>-1</sup>). Photolysis proved to be efficient for high UV radiation doses: above 4200 mJ cm<sup>-2</sup> (45 minutes of reaction).

Through the absorbance spectra of flumequine solutions treated by UV and  $UV/H_2O_2$  it is possible to conclude that the antibiotic was degraded thorughout the reaction time.

Antibacterial activity inhibition was not detectable after  $UV/H_2O_2$  treatment, which indicates that flumequine was degraded through the AOP; this conclusion is sustained by HPLC analyses (degradation higher than 99%). It also shows that the by-products formed during the oxidation did not present stronger antibacterial activity.

The AOP is technically efficient for the treatment of aqueous solutions containing flumequine and is able to inhibit the veterinary drug antibacterial activity.

#### References

- Lin, A. Y-C.; Lin, C-F.; Chiou, J-M.; Hong, P.K. A. J. Hazard. Mater. 2009, 171, 452-458.
- (2) Jones, O.A.H.; Voulvoulis, N.; Lester, J.N. Crit. Rev. Toxicol. 2004, 34, 4, 335-350.
- (3) Reis Filho, R.W.; Barreiro, J.C.; Vieira, E.M.; Cass, Q. B. *Revista Amb-Água* **2007**, *2*, 54-61.
- (4) Ben, W.; Qiang, Z.; Pan, X.; Chen, M. Water Res. 2009, 43, 4392-4402.
- (5) Shen, L.L.; Baranowski, J.; Pernet, A.G. *Biochemistry* 1989, 28, 3879-3885.
- (6) Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Barbosa, J. Anal. Chem. Acta 2003, 477, 21-27.
- Palominos, R.; Freer, J.; Mondaca, M.A.; Mansilla, H.D. J. Photochem. Photobiol. Chem. 2008, 193, 139-145.
- (8) Lai, H-T.; Lin, J-J. Chemosphere 2009, 75, 462-468.
- (9) Melo, S.A.S.; Trovó, A.G.; Beautitz, I.R.; Nogueira, R.F.P. Quim. Nova 2009, 32, 188-197.
- (10) Nieto, J.; Freer, J.; Contreras, D.; Candal, R.J.; Sileo, E.E.; Mansilla, H.D. J. Hazard. Mater. 2008, 155, 45-50.
- Paleologou, A.; Marakas, H.; Xekoukoulotakis, N. P.; Moya, A.; Vergara, Y.; Kalogerakis, N.; Gikas,

J. Adv. Oxid. Technol. Vol. 14, No. 1, 2011 113

P.; Mantzavinos, D. Catal. Today 2007, 129, 136-142.

- (12) Soutsas, K.; Karayannis, V.; Poulios, I.; Riga, A.; Ntampegliotis, K.; Spiliotis, X.; Papapolymerou, G. Desalination 2010, 250, 345-350.
- (13) a) Kim, I.; Yamashita, N.; Tanaka, H. J. *Hazard. Mater.* 2009, *166*, 1134-1140. b) Kim, I.; Yamashita, N.; Tanaka, H. *Chemosphere* 2009, *77*, 518-525
- (14) Lopez, A.; Bozzi, A.; Mascolo, G.; Kiwi, J. *Photochem. Photobiol. Chem.* **2003**, *156*, 121-126.
- (15) Vogna, D.; Marotta, R.; Andreozzi, R.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. *Chemosphere* **2004**, *54*, 497-505.
- (16) Paul, T.; Dodd, M. C.; Strathmann, T. J. Water Res. 2010, 44, 3121-3132.
- (17) Dodd, M.C.; Kohler, H-P. E.; von Gunten, U. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 2498-2504.
- (18) Nogueira, R.F.P.; Guimarães, J. R. Eng. Sanit. Ambient. 1998, 3, 97-100.
- (19) Guimarães, J. R.; Barretto, A. Braz. J. Chem. Eng. 2003, 20, 403-411.
- (20) Nogueira, R.F.P.; Oliveira, M.C.; Paterlini, W.C. *Talanta* 2005, 66, 86-91.

- (21) Neyens, E.; Baeyens, J. J. Hazard. Mater. 2003, B98, 33-50.
- (22) Xu, B.; Gao, N-Y.; Sun, X-F.; Xia, S-J; Rui, M.; Simonnot, M-O; Causserand, C.; Zhao, J-F. J. Hazard. Mater. 2007, B139, 132-139
- (23) Shemer, H.; Linden, K. G. J. Hazard. Mater. 2006, B136, 553-559.
- (24) Hu, L.; Flanders, P.M.; Miller, P.L.; Strathmann, T. J. Water Res. 2007, 41, 2612-2626.
- (25) Nogueira, R.F.P.; Trovó, A.G.; Silva, M.R.; Villa, R.D. Quim. Nova 2007, 30, 400-408.
- (26) Wu, C.; Linden, K. G. Water Res. 2008, 42, 4780-4790.
- (27) Liu B; Liu X.L. Sci. Total Environ. 2004, 74, 269-320
- (28) Maniero, G.M.; Bila, D.M.; Dezotti, M. Sci. Total Environ. 2008, 407, 105-115.
- (29) Van der Graaf, P.H.; Schoemaker, R.C. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* **1999**, *41*, 107-115.

Received for review September 30, 2010. Revised manuscript received December 3, 2010. Accepted December 6, 2010.

## 4.2 Degradação de flumequina por Fenton e foto-Fenton

Artigo "Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity" publicado na revista Science of the Total Environment, volume 445-446, páginas 337 a 346, no ano de 2013. Este artigo corresponde as páginas 60 a 69 desta tese.

#### Science of the Total Environment 445-446 (2013) 337-346



## Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity

Caio Rodrigues-Silva<sup>a</sup>, Milena Guedes Maniero<sup>a</sup>, Susanne Rath<sup>b</sup>, José Roberto Guimarães<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Civil Engineering, Architecture and Urbanism, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6021, CEP 13083-852, Campinas, SP, Brazil
<sup>b</sup> Chemistry Institute, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6154, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brazil

#### HIGHLIGHTS

▶ Photo-Fenton process achieved the maximum performance, degrading 94% of flumequine.

► As the flumequine concentration decreased, antimicrobial activity also decreased.

▶ Four byproducts with *m*/*z* of 244, 238, 220 and 202 were identified.

A degradation pathway for flumequine was proposed.

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 7 August 2012 Received in revised form 21 December 2012 Accepted 21 December 2012 Available online 22 January 2013

Keywords: Antimicrobial activity Byproducts E. coli Fenton Flumequine Photo-Fenton

#### ABSTRACT

Flumequine is a broad-spectrum antimicrobial agent of the quinolone class, and it is widely used as a veterinary drug in food-producing animals. The presence of flumequine in the environment may contribute to the development of drug resistant bacterial strains. In this study, water samples fortified with flumequine (500 µg L<sup>-1</sup>) were degraded using the Fenton and photo-Fenton processes. The maximum degradation efficiency for flumequine by the Fenton process was approximately 40% (0.5 mmol L<sup>-1</sup> Fe(II), 2.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 15 min). By applying UV radiation (photo-Fenton process), the efficiency reached more than 94% in 60 min when 0.25 mmol L<sup>-1</sup> Fe(II) and 10.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used. Under these conditions, the Fenton process was able to reduce the biological activity, whereas the photo-Fenton proces eliminated almost all of the antimicrobial activity because it was not detected. Four byproducts with an m/z of 244, 238, 220 and 202 were derived from decarboxylation and defluorination reactions and from modifications in the alkylamino chain of the fluoroquinolone.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Flumequine is a broad-spectrum synthetic antimicrobial agent that is active against gram-negative bacteria. The primary target of flumequine is the bacterial enzyme DNA-gyrase, which prevents DNA replication and blocks bacterial multiplication (Shen et al., 1989). Due to the efficacy of flumequine for many microbial infections (Ruiz-García et al., 1999), including respiratory infections (Villa et al., 2005), it has been widely used in veterinary medicine and animal husbandry (Villa et al., 2005; Kemper, 2008; Ellingsen et al., 2002).

Antimicrobials, such as flumequine, cannot be completely removed by conventional wastewater treatment systems (Batt et al., 2007; Lai and Lin, 2009); therefore, residues of these compounds often appear in the environment. The scientific community in Europe has already reported the presence of flumequine in soil at concentrations of approximate-ly  $6.9 \ \mu g \ g^{-1}$  (Tamtam et al., 2011) and in aquatic environments at concentrations between 2.5 and 50.0 ng L<sup>-1</sup> (Pozo et al., 2006;

Tamtam et al., 2008). Little is known about the fate of antimicrobials in the environment, which raises concerns about the possibility of bacteria mutation resulting in microbial resistance (Reyes et al., 2006).

The Fenton and photo-Fenton processes have been reported to be possible methods for removing flumequine from municipal wastewater treatment plants (Klamerth et al., 2010, 2011) and distilled water (Sirtori et al., 2009). However, this study is the first dedicated to the quantitative evaluation of residual antimicrobial activity. This evaluation is required because even after the extensive degradation of the original compound, the remaining solution may still have antimicrobial activity that is equal to or even stronger than the original solution due to possible byproducts formed by the advanced oxidation processes (AOPs). Therefore, analysis of the residual antimicrobial activity is critical for reducing the risk of bacterial resistance. It is also important to highlight the scarcity of research on the quantitative evaluation of residual antimicrobial activity of solutions subjected to AOPs (Dodd et al., 2009; Paul et al., 2010; da Silva et al., 2011). AOPs involve the formation of hydroxyl radicals ('OH), which are capable of mineralizing organic compounds due to their high oxidation potential.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 2378; fax: +55 19 3521 2411. *E-mail address:* jorober@fec.unicamp.br (J.R. Guimarães).

<sup>0048-9697/\$ -</sup> see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.079

According to Shen et al. (1989), the antimicrobial activity of flumequine is related to the hydrogen bonds between the carbonyl groups on the quinolone ring and the hydrogen bond donors of the DNA bases on the separated DNA strands. The hydrogen bonding domain of the fluoroquinolones is located where the acceptors, C=O, COOH and F, are present. Therefore, the deactivation of antimicrobial activity could be related to reactions at these positions.

The purpose of this study is to evaluate the degradation of flumequine using Fenton's reagent  $(H_2O_2/Fe(II))$  and photo-Fenton  $(UV/H_2O_2/Fe(II))$  processes and the reduction in antimicrobial activity. Furthermore, the byproducts formed during these reactions were identified.

#### 2. Experimental

#### 2.1. Chemicals

Flumequine (99%) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA), and its molecular formula and molecular weight are  $C_{14}H_{12}FNO_3$  and 261.25 g mol<sup>-1</sup>, respectively. Methanol (HPLC grade) and BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (99%) were purchased from J. T. Baker (Edo. de México, Mexico); oxalic acid (99.5%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany); hydrogen peroxide (30%, v/v), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (99%), NaHSO<sub>3</sub> (58.5% of SO<sub>2</sub>), concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and NaOH (97%) were purchased from Synth (Diadema, Brazil); H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%) were purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil); KOH (85%) was purchased from Ecibra (São Paulo, Brazil); and NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> (99%) was purchased from Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Mueller-Hinton broth cultures were purchased from Himidia, and agar was purchased from Biobrás (Mumbai, India). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q Academic water purification system (Millipore) and used throughout the studies.

#### 2.2. Stock solution

A flumequine stock solution (250 mg L<sup>-1</sup>) was prepared in methanol, and stored at 4 °C, protected from light. Flumequine working solutions (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) for the Fenton and photo-Fenton processes were prepared daily by appropriate dilution of the stock solution with ultrapure water.

#### 2.3. Experimental setup

The degradation assays were performed using a system that was composed of a reactor (made of borosilicate glass – 3.5 cm inner diameter and a 38.5 cm length – with a concentric low-pressure mercury lamp – 2.4 cm diameter – operating at 15 W with  $\lambda_{max} = 254$  nm with a useable volume of 190 mL), a magnetic stirrer, a 1000 mL reservoir, and a peristaltic pump to keep the solution in constant recirculation. In this experimental system, the lamp was in direct contact with the circulating solution. A similar experimental system on a larger scale was used by Guimarães et al. (2012).

The average irradiance was 8.3 mW cm<sup>-2</sup>, as measured using a Cole Parmer (VLX 3W model) radiometer that was previously calibrated at 254 nm. The radiation dose, D (J cm<sup>-2</sup>), was measured as the product of the irradiance (W cm<sup>-2</sup>) multiplied by the exposure time (s) (Eq. (1)).

$$D = E \times t_{irradiation}$$
 (1)

where D is related to the UV radiation dose, E represents the irradiance and  $t_{irradiation}$  is the exposure time to UV radiation.

The Fenton and photo-Fenton processes were evaluated between 0 and 60 min. The concentration of hydrogen peroxide was varied from 0.5 to 10.0 mmol  $L^{-1}$ . FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O was used as the catalyst, as suggested by Li et al. (2009) and Dal Bosco et al. (2011), and the Fe(II) concentration was varied between 0.25 and 1.0 mmol  $L^{-1}$ . All of the Fenton and photo-Fenton reactions were stopped by the addition of sodium bisulfite at a 1:1 molar ratio with hydrogen peroxide. All of the assays were

performed at pH 2.8, which is in the effective pH range for Fenton's reagent.

To identify the byproducts formed during the degradation processes, aqueous solutions containing 5 mg L<sup>-1</sup> of flumequine were used to avoid the loss of byproducts during the concentration step. The Fenton and photo-Fenton processes were evaluated between 0 and 60 min using 5.0 mmol L<sup>-1</sup> Fe(II) and 10.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.4. Analytical methods

#### 2.4.1. High performance liquid chromatography

The degradation of flumequine was evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. The preparation of the samples before quantification was performed by solid phase extraction (SPE). SPE was performed using a  $C_{18}$  solid phase cartridge (Varian 500 mg/6 mL) that had been conditioned with methanol (6 mL) and water (6 mL). One liter of the sample was percolated through the cartridges at a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup>. Subsequently, the sorbent was dried under vacuum, and the analyte was eluted with methanol (4.0 mL). The eluates were filtered (0.22 µm membrane filters) before the HPLC analyses. The recoveries ranged from 89 to 104% for samples containing flumequine in the concentration range of 50 to 500 µg L<sup>-1</sup>.

The chromatographic system consisted of a Waters solvent delivery system (model 510), a Tunable Absorbance Detector (model 486) and a Rheodyne 7725 injector with a sample loop of 20 µL. Quantitation was performed at 236 nm. The analytical column used was an XBridge® RP18 from Waters (250 mm × 4.6 mm l.D., 5 µm). The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Methanol:0.01 mol L<sup>-1</sup> oxalic acid (60:40 v/v) was used as the mobile phase. The LOD and LOQ were 0.24 µg L<sup>-1</sup> and 1.0 µg L<sup>-1</sup>, respectively, using a concentration factor of 250.

#### 2.4.2. Spectrophotometry

UV–vis spectra were obtained in the wavelength range of 200 to 800 nm with a Shimadzu model UV-1601 PC spectrophotometer. Initial sample solutions containing 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of flumequine and samples submitted to the Fenton processes were analyzed. Due to the low concentration of flumequine in the samples, the flumequine was first concentrated by SPE using the same procedure described for the HPLC analyses.

#### 2.4.3. Mass spectrometry

The detection and identification of the byproducts formed during the advanced oxidation processes were evaluated using a Micromass® quadrupole (Q)-time of flight (ToF) mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). Data processing was conducted using the MassLynx software (Waters, Milford, MA, USA). Spectra were acquired between m/z 100 and 600. The typical operating conditions were as follows: cone gas flow (50 L h<sup>-1</sup>), desolvation gas flow (300 L h<sup>-1</sup>), polarity (ES +), capillary energy (1300 V), sample cone energy (35 V), extraction cone energy (5 V), desolvation temperature (250 °C), source temperature (150 °C), ionization energy (1700 V).

#### 2.5. Antimicrobial activity assay

First, a sample of *Escherichia coli* K12 wild type (ATCC: 23716) in a Mueller-Hinton-glycerol (60:40, v/v) solution was thawed at 25 °C. Then, 0.1 mL of this culture was inoculated in 10 mL of Mueller-Hinton broth, and the broth culture was incubated for 24 h at 37 °C on a shaker (100 rpm) (Marconi, model MA-420, Piracicaba, Brazil). The 24-h *E. coli* culture was diluted to match the absorbance of a McFarland stock solution (0.5 mL of 0.048 mol L<sup>-1</sup> BaCl<sub>2</sub> in 99.5 mL of 0.18 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at 630 nm. This absorbance corresponded to a population density of  $1.0 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. The antimicrobial activity was evaluated using the *E. coli* K12 culture at a population density of  $1.0 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>.

The antimicrobial activity assays were performed according to the method of Paul et al. (2010) with certain modifications. The initial and degraded samples were first diluted 50-fold in 1.0 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 8). A 300 µL aliquot of the 50× diluted sample was added to the first well of each row of a 96-well microtiter plate, and 100  $\mu$ L of 1 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 8) was added to all wells of the plate except the first well of each row. Subsequently, a 10-member 3:2 serial dilution (i.e., 1.5-fold) series was prepared from each sample across the corresponding row by dosing 200 µL of the solution from the first well to the next well (2nd) and repeating this sequence until the 11th well. The last well (i.e., the 12th well) contained only the buffer solution. After the serial dilution, all wells of the row plate were then inoculated with 100 µL of the E. coli K12 culture solution. The plate was sealed and incubated under 100 rpm (Marconi, model MA-420, Piracicaba, Brazil) agitation for 8 h at 37 °C. After incubation, the absorbance of each sample well was measured at 630 nm using a Multiskan MS microplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). The antimicrobial activities of the flumequine standards (control), the initial solution (t=0 min) and the samples subjected to the processes (t = 15, 30, 45, and 60 min) were quantified in duplicate using previously reported procedures (da Silva et al., 2011).

Absorbance measurements were converted to growth inhibition values (%), I, according to Eq. (2).

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$
 (2)

where  $A_0$  is the absorbance of the phosphate buffer incubated with *E. coli* culture, and A refers to the absorbance of the sample incubated in each well; both absorbances were determined at 630 nm.

The dose–response curves and the  $EC_{50}$  (the effective dose at which 50% growth inhibition is achieved) values of the treated and untreated solutions were evaluated using the Graph-Pad Prism 5.0 software (La Jolla, CA, USA). The dose–response curves, which represent the relationship between the log serial dilution and the growth inhibition percentage (Eq. (2)), were evaluated using Eq. (3).

$$I(\%) = I_{min,t} + \frac{I_{max,t} - I_{min,t}}{\left(1 + 10^{\left(\log EC_{50} - \log(\frac{1}{m^{t}})\right) \times H}\right)}$$
(3)

where  $I_{max,t}$  and  $I_{min,t}$  represent the maximum and minimum growth inhibition for each data sample, respectively;  $EC_{50}$  is the effective dose at which 50% growth inhibition is achieved; m is the serial dilution factor (i.e. 1.5-fold); n is the number of dilutions; and H is the Hill slope for the experimental conditions.

#### 2.6. Toxicity tests with Vibrio fischeri

The toxicity assays were carried out according to standard L5.227 (CETESB, 2001), using a Microtox Model 500 Analyzer (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, USA). The toxicity of the initial solution and of the solutions submitted to the photo-Fenton process was evaluated, monitoring the changes in initial *V. fischeri* luminescence and their luminescence after 15 min of exposure. The samples were serially diluted (1:2); the concentration varied between 89.1% and 0.32%. The results were expressed as EC<sub>50</sub> (effective concentration responsible for 50% inhibition of luminescence) and were calculated following the established protocol of the Microtox program (SDI MicrotoxOmni 4.0) (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, USA).

#### 3. Results and discussion

#### 3.1. Degradation by the Fenton and photo-Fenton processes

In the present study, the tests were performed using a 15 W low pressure mercury lamp with a maximum emission at 254 nm to allow the comparison between the Fenton and photo-Fenton processes with our previous work (UV and  $UV/H_2O_2$ ) (da Silva et al., 2011).

The Fenton degradation was rapid within the first 15 min of the reaction and then no further degradation was observed. However, for the irradiated samples (photo-Fenton), faster degradation of flumequine occurred within the first 15 min and was then followed by a gradual degradation (Fig. 1).

The Fenton's reagent generates hydroxyl radicals as a result of the interaction between hydrogen peroxide and the ferrous ion, which causes the oxidation of Fe(II) to Fe(III) under acidic conditions (Eq. (4)) (Rozas et al., 2010). The reaction rate will decrease due to consumption of the reagents (Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Eq. (4)) and the extremely slow reduction of Fe(III) to Fe(II) (Eq. (5)) (Rozas et al., 2010).

$$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + (OH)^- + OH, k = 53 - 76 Lmol^{-1}s^{-1}$$
 (4)

$$Fe(III) + H_2O_2 \Rightarrow Fe(II) + HO_2 + H^+, k = 1 - 2 \times 10^{-2} Lmol^{-1} s^{-1}$$
 (5)

The photo-Fenton process is more efficient due to the photoreduction of the ferric ion by UV radiation (Eq. (6)) (Rozas et al., 2010); the reaction stops when the hydrogen peroxide is completely consumed.

$$Fe(III) + H_2O + h\nu \rightarrow Fe(II) + H^+ + OH$$
(6)

The best result for the Fenton process is presented in Fig. 1(d), where 0.5 mmol L<sup>-1</sup> Fe(II) and 2.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in the degradation of 40% of the flumequine after 15 min of reaction. The lowest efficiency of the Fenton process was observed using 0.25 mmol L<sup>-1</sup> Fe(II) and 10.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1(a)). However, under this condition, a UV radiation dose of 1420 mJ cm<sup>-2</sup> was sufficient to achieve the best

 $\label{eq:result} {\bf t} \ ({\rm min}) \\ {\bf Fig. 1. Degradation of flumequine. Fenton: (a) $C_{Fe(II)} = 0.25 $ mmol $L^{-1}$ and $C_{H_2O_2} = $10.0 $ mmol $L^{-1}$, (b) $C_{Fe(II)} = 0.5 $ mmol $L^{-1}$ and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, (c) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$ and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, and (d) $C_{Fe(II)} = $0.5 $ mmol $L^{-1}$ and $C_{H_2O_2} = $2.0 $ mmol $L^{-1}$. Photo-Fenton: (e) $C_{Fe(II)} = $0.25 $ mmol $L^{-1}$ and $C_{H_2O_2} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, (f) $C_{Fe(II)} = $0.5 $ mmol $L^{-1}$, (g) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, (f) $C_{Fe(II)} = $0.5 $ mmol $L^{-1}$, and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, (g) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, (f) $C_{Fe(II)} = $0.5 $ mmol $L^{-1}$, and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, (g) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, (g) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ mmol $L^{-1}$, (g) $C_{Fe(II)} = $1.0 $ mmol $L^{-1}$, and $C_{H_2O_2} = $4.0 $ m$ 



degradation result for the photo-Fenton reaction within 15 min, which reduced approximately 86% of the flumequine (Fig. 1(e)). As published before (da Silva et al., 2010), photolysis itself degraded only 25.8% of flumequine at a UV radiation dose of 1420 mJ cm<sup>-2</sup>, i.e., photo-Fenton was 3.3 times more efficient than photolysis and 2.2 times more than Fenton. By increasing the reaction time to 60 min (i.e., 11.4 min of illumination and 5680 mJ cm<sup>-2</sup> total radiation), photolysis degraded 91% of the flumequine (da Silva et al., 2010), and the photo-Fenton process achieved 94% of drug degradation. Finally, all of the photo-Fenton reactions performed better than the reactions performed in the dark (Fenton's reagent).

Considering the best conditions for each process and comparing these results with our previous work (da Silva et al., 2011), it is possible to conclude that, after 30 min, the efficiency for the degradation of flumequine was as follows:  $UV/H_2O_2 > photo-Fenton > UV > Fenton > H_2O_2$ .

Klamerth et al. (2010) evaluated the efficiency of the Fenton and photo-Fenton processes for treating municipal wastewater contaminated with 15 emerging contaminants, including flumequine, using solar light. The addition of 5 mg L<sup>-1</sup> Fe(II) (0.09 mmol L<sup>-1</sup>) and 50 mg L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5 mmol L<sup>-1</sup>) did not reduce more than 35% of the initial flumequine concentration (100 µg L<sup>-1</sup>), but by applying UV radiation, the degradation of flumequine reached almost 100% after 60 min (approximately 38 min of illumination). Sirtori et al. (2009) used 2 mg L<sup>-1</sup> to degrade 20 mg L<sup>-1</sup> of flumequine using the solar photo-Fenton process and reached complete degradation after 18 min of illumination.

3.1.1. Influence of  $H_2O_2$  and Fe(II) concentrations on the Fenton process

In the Fenton process, it is important to establish the best  $H_2O_2$  and Fe(II) concentrations for rapid and efficient oxidation. The optimum doses of the oxidant and catalyst are inter-related and are therefore the key to achieving the maximum degradation efficiency and the minimum consumption of reagents, thereby minimizing costs. Using the ferrous ion concentration at 0.25 mmol  $L^{-1}$  (Fig. 2(a)) and varying the hydrogen peroxide concentration from 0.5 to 10.0 mmol  $L^{-1}$  resulted in only a minor degradation rate.

When 0.5 mmol  $L^{-1}$  ferrous ion was used (Fig. 2(b)), the degradation of flumequine increased from 20 to 40% when the concentration of hydrogen peroxide increased from 0.5 to 2.0 mmol  $L^{-1}$  for a 15 min reaction. Subsequent increases in the concentration of  $H_2O_2$  in the process decreased the degradation of flumequine to 15% and 8% for  $H_2O_2$  initial concentrations of 4.0 and 10.0 mmol  $L^{-1}$ , respectively. The same behavior was observed when 1.0 mmol  $L^{-1}$  ferrous ion was used and the  $H_2O_2$  concentration was increased from 1.0 to 10.0 mmol  $L^{-1}$  (Fig. 2(c)). A molar ratio of Fe(II):H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> higher than 1 can increase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and also the competition for 'OH (Neyens and Baeyens, 2003). As shown in Fig. 2(c), this phenomenon most likely occurred when the Fe(II):H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ratio of 1:0.5 was used. Based on these results, Fe(II) concentrations higher than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration were not evaluated for the photo-Fenton process.

When 1.0 or 2.0 mmol  $L^{-1}$  of  $H_2O_2$  were used, an increase in the concentration of the ferrous ion from 0.25 to 0.5 mmol  $L^{-1}$  resulted in a significant increase in the degradation of flumequine; however, increasing the concentration of  $H_2O_2$  from 0.5 to 1.0 mmol  $L^{-1}$  did not resulted in further degradation. For  $H_2O_2$  concentrations of 4.0 and 10.0 mmol  $L^{-1}$ , the degradation of flumequine increased as the concentration of the ferrous ion increased from 0.25 to 1.0 mmol  $L^{-1}$ .

3.1.2. Influence of  $H_2O_2$  and Fe(II) concentrations on the photo-Fenton process

The initial concentration of  $H_2O_2$  applied in the photo-Fenton process significantly influenced the flumequine degradation rate (Fig. 3). A progressive improvement in the degradation of fluoroquinolone was observed when the initial ferrous ion concentration was 0.25 or 0.5 mmol L<sup>-1</sup> and the hydrogen peroxide concentration increased from 1.0 to 10.0 mmol L<sup>-1</sup> (Fig. 3(a) and (b)). However,



Fig. 2. Degradation of flumequine by the Fenton process, varying  $C_{H_2O_2}$  from 0.5 to 10.0 mmol  $L^{-1}$ . (a)  $C_{Fe(II)}\!=\!0.25$  mmol  $L^{-1}$ , (b)  $C_{Fe(II)}\!=\!0.5$  mmol  $L^{-1}$ , and (c)  $C_{Fe(II)}\!=\!1.0$  mmol  $L^{-1}$ .

when 1.0 mmol  $L^{-1}$  of catalyst ion was used (Fig. 3(c)), a different behavior was observed. The degradation of flumequine increased with increasing oxidant concentration up to 2.0 mmol  $L^{-1}$ . Lower



between them and the hydrogen peroxide, as illustrated by Eqs. (7) to (9) (Melo et al., 2009).

341

$$OH + OH \rightarrow H_2O_2$$
 (7)

$$OH + O_2H \rightarrow H_2O + O_2 \tag{8}$$

$$OH + H_2O_2 \rightarrow O_2H + H_2O \tag{9}$$

For the photo-Fenton process, using the initial concentration of  $H_2O_2$  at 1.0 mmol L<sup>-1</sup> and increasing the initial concentration of the ferrous ion from 0.25 to 1.0 mmol L<sup>-1</sup> significantly increased the degradation. Increasing the catalyst concentration most likely improved the degradation of flumequine. However, when a higher concentration of  $H_2O_2$  (i.e., 4.0 mmol L<sup>-1</sup>) was used, the oxidation of this fluoroquinolone decreased with increasing initial concentration of the ferrous ion. In excess, Fe(II) or  $H_2O_2$  may act as a hydroxyl radical scavenger, which decreases the degradation efficiency (Dal Bosco et al., 2011).



**Fig. 3.** Degradation of flumequine by the photo-Fenton process, varying  $C_{H_{2}O_{2}}$  from 1.0 to 10.0 mmol L<sup>-1</sup>. (a)  $C_{Fe(I)}=0.25$  mmol L<sup>-1</sup>, (b)  $C_{Fe(I)}=0.5$  mmol L<sup>-1</sup>, and (c)  $C_{Fe(I)}=1.0$  mmol L<sup>-1</sup>.

degradation of the drug was observed when the hydrogen peroxide concentration was higher than 4.0 mmol  $L^{-1}$ . This behavior was likely due to the recombination of hydroxyl radicals and/or reaction

**Fig. 4.** Absorbance spectra of flumequine solutions degraded by (a) the Fenton process  $(C_{H_2O_i}=2.0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{Fe(II)}=0.25 \text{ mmol } L^{-1})$ , and (b) the photo-Fenton process  $(C_{H_{2O2}}=10.0 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{Fe(II)}=0.25 \text{ mmol } L^{-1})$ .

#### 3.2. UV-vis spectrometry

As previously reported by da Silva et al. (2011), flumequine showed maximum absorption at 236 nm, and a weaker absorption at 324 nm. According to Neugebauer et al. (2005), the UV–vis spectra of fluoroquinolones show a characteristic absorption band between 300 and 380 nm and a second maximum absorbance between 240 and 300 nm due to the aromatic ring.

The UV-vis spectra for a flumequine standard solution (t=0 min) and sample solutions subjected to the Fenton (Fig. 4(a)) and photo-Fenton (Fig. 4(b)) processes, under the optimal conditions, were compared. A significant difference in the absorbance values for the samples subjected to the Fenton and photo-Fenton processes was observed. For the samples submitted to the Fenton process, a minor modification in the UV profile of the samples was verified (Fig. 4(a)). Note that 15 min of reaction was sufficient to achieve minimum absorbance at the characteristic wavelengths of flumequine, which indicates the maximum degradation of flumequine in this process. For photo-Fenton process, the absorbance band in the range of 200–400 nm decreased with time (Fig. 4(b)), which indicated that the flumequine concentration continuously decreased.

#### 3.3. Evaluation of residual antimicrobial activity

To evaluate possible antimicrobial activity, assays were performed on samples subjected to the Fenton and photo-Fenton processes and compared to the untreated samples (t=0 min). The effective dose at which 50% growth inhibition was achieved (EC<sub>50</sub>) was initially evaluated. The

flumequine stock solution (250 mg L<sup>-1</sup>) was diluted 100-fold in phosphate buffer at pH 8, and then it was serially diluted. The dose–response curves of the control were obtained for a flumequine concentration range of 1.25 mg L<sup>-1</sup> to 21.7 µg L<sup>-1</sup>, which corresponds to the concentrations inside of each well in the plate. Ten different assays (in duplicate) were performed to obtain the EC<sub>50</sub>, which varied from  $14.0 \times 10^{-5}$  to  $15.3 \times 10^{-5}$  g L<sup>-1</sup>. The median value ( $14.65 \times 10^{-5}$  g L<sup>-1</sup>) was the control value for evaluating the dose–response curves of the untreated solutions (t=0 min).

3.3.1. Residual antimicrobial activity of the solutions after the Fenton process

The dose–response curves obtained for the solutions subjected to the Fenton's reagent are presented in Fig. 5. The antimicrobial activity decreased as the flumequine concentration in the solution decreased. It was verified that no changes in the dose–response curves occurred after 15 min of reaction. As previously presented (Fig. 1), the degradation of flumequine by the Fenton process reached a maximum after 15 min. Potency equivalent values (PEQ), which represent the relationship between the EC<sub>50</sub> of the untreated samples and EC<sub>50</sub> of the solutions subjected to a degradation process (Eq. (10)), can be used to analyze the changes in the biological activity of a solution.

$$PEQ = \frac{EC_{50,0}}{EC_{50,x}}$$
(10)

where PEQ is the potency equivalent value, EC<sub>50,0</sub> represents the

effective dose at which 50% growth inhibition was observed in the



Fig. 5. Dose-response curves for flumequine degradation by the Fenton process: (a)  $C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1} \text{ and } C_{H_2O_2} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (b)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (c)  $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ .

65



Fig. 6. Dose-response curves for flumequine degradation by the photo-Fenton process: (a)  $C_{Fe(II)} = 0.25 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 10.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (b)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , (c)  $C_{Fe(II)} = 1.0 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 4.0 \text{ mmol } L^{-1}$ , and (d)  $C_{Fe(II)} = 0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  and  $C_{H_2O_2} = 2.0 \text{ mmol } L^{-1}$ .

untreated flumequine solution and  $EC_{50,x}$  is the  $EC_{50}$  value calculated for each sample submitted to a degradation process.

By evaluating the PEQ, it is possible to conclude that the reduction in antimicrobial activity is related to the degradation of flumequine, which suggests that the byproducts formed during



Fig. 7. Luminescence inhibition assay with Vibrio fischeri.

the degradation process did not have higher antimicrobial activity than flumequine.

The Fenton process using Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations (mmol L<sup>-1</sup>) of 0.25 and 10.0 (Fig. 5(a)), 0.5 and 4.0 (Fig. 5(b)), 1.0 and 4.0 (Fig. 5(c)), and 0.5 and 2.0 (Fig. 5(d)), respectively, resulted in significantly different EC<sub>50</sub> values. In the 15 min of reaction, the potency equivalent value (PEQ) decreased to 0.63, 0.53, 0.46 and 0.38, respectively, when compared with the initial solution (i.e., the activity was reduced from 37 to 62%). Therefore, increasing the efficiency of the degradation of flumequine, the PEQ was proportionally reduced. These results are consistent with data published by Dodd et al. (2009), Paul et al. (2010) and da Silva et al. (2011), which all observed that the antimicrobial activity decreased after degradation by AOPs.

#### 3.3.2. Residual antimicrobial activity after photo-Fenton process

Unlike in the degradation using the Fenton's reagent, the reaction time in the photo-Fenton process directly influenced the degradation of flumequine and the residual antimicrobial activity. The dose–response curves are shown in Fig. 6. In the experiments performed with 0.25 mmol  $L^{-1}$  Fe(II) and 10.0 mmol  $L^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, where the best degradation of flumequine was achieved (94%), no antimicrobial activity was observed after 15 min of reaction (Fig. 6(a)). Other combinations of catalyst and oxidant were not able to remove biological activity in less than 60 min. Comparing all conditions at 15 min, the PEQ value decreased from 1.0 (initial solution, t=0 min) to 0.20, 0.33, and 0.40, respectively, for the reactions

using Fe(II) and  $H_2O_2$  concentrations (mmol L<sup>-1</sup>) of 0.5 and 4.0 (Fig. 6(b)), 1.0 and 4.0 (Fig. 6(c)) and 0.5 and 2.0 (Fig. 6(d)). These results indicated that the antimicrobial activity of the solutions were reduced 80, 67 and 60%, respectively.

By applying the Fenton process (1.0 mmol  $L^{-1}$  Fe(II) and 4.0 mmol  $L^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the antimicrobial activity of the solution was reduced by 54%. The samples subjected to the photo-Fenton process presented lower antimicrobial activity; it was reduced 67% in 15 min. Due to the photoreduction of Fe(III) to Fe(II), the biological activity of the solution continuously decreased and achieved a maximum reduction of 80% after 60 min. Therefore, the more efficient the degradation, the lower the observed antimicrobial activity.

#### 3.4. Toxicity assays

To evaluate the toxicity of the treated solutions, biological tests with *V. fischeri* were carried out for the samples submitted to the photo-Fenton process and compared to the toxicity of the untreated samples (t = 0 min). The assays were performed using the best condition for the photo-Fenton process, that is, Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of 0.25 and 10.0 mmol L<sup>-1</sup> respectively (as shown in Fig. 1). No alteration in toxicity was observed for reaction times from 0 to 60 min (Fig. 7).

A solution containing 15 emerging contaminants including flumequine was shown to have its toxicity increased when submitted

to photo-Fenton process (Klamerth et al., 2010). However, Backhaus et al. (2000) reported that the toxicity of chemicals with a different mode of action cannot be predicted by increasing concentration. It can only be determined for a specific group of action compounds with common molecular mechanisms. Based on the fact that toxicity of flumequine samples did not vary regardless of the reaction time, the evaluation of residual antimicrobial activity of flumequine and its intermediates become the main concern.

## 3.5. Identification of byproducts formed during flumequine degradation by the Fenton and photo-Fenton processes

Analyses of the molecular ions, fragmented ions and isotopic distribution allowed the assignment of a chemical structure to four molecular ions (m/z of 244, 238, 220 and 202) identified in the full scan spectra of the flumequine solutions submitted to the Fenton and photo-Fenton processes. These ions were selected as precursor ions and fragmented. Although some of the flumequine intermediates had been previously reported (Palominos et al., 2008; Sirtori et al., 2009, 2012), none of these studies related the byproducts with the residual antimicrobial activity. The focus of this study was to increase the knowledge about the formation of intermediates during the Fenton and photo-Fenton processes and address their antimicrobial activity.

Fluoroquinolones, which are polynuclear heteroaromatics, are not expected to photorearrange (Albini and Monti, 2003), and the sequence



Fig. 8. Proposed flumequine oxidation byproducts formed by the Fenton and photo-Fenton processes.

of reactions with hydroxyl radicals or after photoexcitation is through substitution and/or elimination reactions (Albini and Monti, 2003; Vasconcelos et al., 2009; Sturini et al., 2012). According to Albini and Monti (2003), the main photoreaction that occurs under neutral conditions is the defluorination of fluoroquinolones, which is then followed by decarboxylation. Furthermore, these heterocyclic fluorine compounds might remain intact when the reactions occur under acidic conditions, leading to reactions with the alkylamino side chain first (Pretali et al., 2010). The primary reaction in the alkylamino site of the flumequine molecule that is proposed is the cleavage of the 1N-C bond in the non-aromatic ring. This reaction would afford 8-ethyl-6-fluoro-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-3-carboxylic acid (Fig. 8, Compound A, m/z of 238).

Because hydroxyl radicals have a high oxidation potential (E<sup>0</sup>=2.80 V) and attack organic molecules non-selectively under acidic conditions (as in the Fenton and photo-Fenton reactions; pH = 2.8), photochemical defluorination could be considered a possible pathway in the degradation of flumequine. Sirtori et al. (2009) monitored the degradation of flumequine by the photo-Fenton process and photocatalysis and verified that a considerable amount of fluorine was present as fluoride (F<sup>-</sup>), which supports the defluorination pathway. The hydroxyl radicals, once in contact with the compound, first promote loss of a fluoride ion, generating 5-methyl-1-oxo-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij] quinoline-2-carboxylic acid (Fig. 8, Compound D, m/z of 244). The loss of the fluoride (F<sup>-</sup>) results in a decrease of the hydrogen bonding affinity 840-fold (Shen et al., 1989); therefore, the antimicrobial activity of the compound m/z 244 may be lower than of flumequine. After defluorination, decarboxylation yields 9-fluoro-5-methyl-1-oxo-6,7dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-2-carboxylic acid (Fig. 8, Compound F, m/z of 202). According to Shen et al. (1989), the quinolones require the 3-carboxyl group for activity; therefore, the proposed Compounds E and F (m/z 202) do not present antimicrobial activity.

The pathway where decarboxylation occurs first, which leaves the aromatic ring with the fluorine intact, was also considered. In this case, the molecule likely loses a carboxyl group, forming a byproduct of m/z 220 (Fig. 8, Compound B or C), and therefore, it loses its activity. This compound can then react with hydroxyl radicals in solution until the cleavage of the C–F bond occurs and Compound E and/or F is formed.

Finally, it is important to highlight that even after 60 min, flumequine could still be identified after the Fenton and photo-Fenton processes by mass analysis, in addition to a considerable number of byproducts with low signal intensity.

#### 4. Conclusions

The photo-Fenton process was the most efficient method for the degradation of flumequine, whereas the Fenton's reagent had the lowest performance regardless of the concentrations of hydrogen peroxide and ferrous ion used (0.5 to 10.0 mmol  $L^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.25 to 1.0 mmol  $L^{-1}$ Fe(II)).

A significant difference in the residual antimicrobial activity of the solutions subjected to the Fenton and photo-Fenton processes was verified. The antimicrobial activity assays presented quantitative data related to the residual biological activity of the solutions submitted to AOPs. The studied processes were not able to completely mineralize the flumequine; however, it was demonstrated that this fluoroquinolone oxidation was sufficient to deactivate the antimicrobial activity. The byproducts did not present stronger biological activity than flumequine because as the flumequine concentration decreased, the antimicrobial activity also decreased.

In conclusion, the photo-Fenton process is an efficient method for treating aqueous solutions that contain flumequine, and it is able to reduce the antimicrobial activity of these solutions. Finally, the antimicrobial activity assays could be performed to evaluate the treatment of effluents containing antimicrobial drugs.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge CAPES for providing scholarships to M. G. Maniero (PNPD0233080) and C. Rodrigues-Silva, and FAPESP for financial support (2008/06470-0). The authors also thank Dr. J. A. R. Paschoal for MS analysis and Prof. M. Dezotti for supplying *E. coli*.

#### References

- Albini A, Monti S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. Chem Soc Rev 2003;32:238–50.
- Backhaus T, Scholze M, Grimme LH. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium Vibrio fischeri. Aquat Toxicol 2000;49:49–61.
- Batt AL, Kim S, Aga DS. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. Chemosphere 2007;68:428–35.
- 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].
- Da Silva CR, Maniero MG, Rath S, Guimarães JR. Antibacterial activity inhibition after the degradation of flumequine by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. J Adv Oxid Technol 2011;14(1):106–14. Dal Bosco SM, Barbosa IM, Candello FP, Maniero MG, Rath S, Guimarães JR. Degradation
- Dal Bosco SM, Barbosa IM, Candello FP, Maniero MG, Rath S, Guimarães JR. Degradation of ivermectin by Fenton and photo-Fenton and toxicity test using Daphnia similis. J Adv Oxid Technol 2011;14(2):292–301.
- Dodd MC, Kohler H-PE, von Gunten U. Oxidation of antibacterial compounds by ozone and hydroxyl radical: elimination of biological activity during aqueous ozonation processes. Environ Sci Technol 2009;43(7):2498–504.
- Ellingsen OF, Midthun B, Rogstad A, Syvertsen C, Samuelsen OB, Dosage regime experiments with oxolinic acid and flumequine in Atlantic salmon (Salmo salar L) held in seawater. Aquaculture 2002;209:19–34.
- Guimarães JR, Maniero MG, de Araújo RN. A comparative study on the degradation of RB-19 dye in an aqueous medium by advanced oxidation processes. J Environ Manag 2012;110:33–9.
- Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol Indic 2008;8:1-13.
- Klamerth N, Rizzo L, Malato S, Maldonado MI, Agüera A, Fernández-Alba AR. Degradation of fifteen emerging contaminants at µg L<sup>-1</sup> initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. Water Res 2010;44:545–54.
- Klamerth NL, Malato S, Maldonado MI, Agüera A, Fernández-Alba AR. Modified photo-Fenton for degradation of emerging contaminants in municipal wastewater effluents. Catal Today 2011;161:241–6.
- Lai H-T, Lin J-J. Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments. Chemosphere 2009;75:462–8.
  Li Y, Zhang P, Wu M, Liu W, Yi Z, Yang M, et al. An effective oxidation of 2,3,6-
- Li Y, Zhang P, Wu M, Liu W, Yi Z, Yang M, et al. An effective oxidation of 2,3,6trimethylphenol to 2,3,5-trimethylbenzoquinone using Fenton's reagent under mild conditions. Chem Eng J 2009;146:270–4. Melo SAS, Trovó AC, Bautitz IR, Nogueira RFP. Degradation of residual pharmaceuticals
- Melo SAS, Trovó AG, Bautitz IR, Nogueira RFP. Degradation of residual pharmaceuticals by advanced oxidation processes. Quim Nova 2009;32(1):188–97. Neugebauer U, Szeghalmi A, Schmitt M, Kiefer W, Popp J, Holzgrabe U. Vibrational spectro-
- Neugebauer U, Szeghalmi A, Schmitt M, Kiefer W, Popp J, Holzgrabe U. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. Spectrochim Acta A: Mol Biomol 2005;61: 1505–17.
- Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. J Hazard Mater B 2003;98:33–50.
  Palominos R, Freer J, Mondaca MA, Mansilla HD. Evidence for hole participation during
- Palominos K, Freer J, Mondaca MA, Mansilla HD. Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. J Photochem Photobiol A: Chem 2008;193:139–45.
- Paul T, Dodd MC, Strathmann TJ. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity. Water Res 2010:44:3121-32.
- Pozo OJ, Guerrero C, Sancho JV, Ibáñez M, Pitarch E, Hogendoorn E, et al. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid. J Chromatogr A 2006;103:83–93.
- Pretali L, Fasani E, Dondi D, Mella M, Albini A. The unexpected photochemistry of marbofloxacin. Tetrahedron Lett 2010;51:4696–8.
- Reyes C, Fernández J, Freer J, Mondaca MA, Zaror C, Malato S, et al. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. J Photochem Photobiol A: Chem 2006;184:141–6.
- Rozas O, Contreras D, Mondaca MA, Pérez-Moya M, Mansilla HD. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. J Hazard Mater 2010;177:1025–30.
- Ruiz-García A, Bermejo M, Merino V, Sánchez-Castaño G, Freixas J, Garrigues TM. Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. Eur J Pharm Biopharm 1999;48:253–8.
- Shen LL, Mitscher LA, Sharma PN, O'Donnell TJ, Chu DWT, Cooper CS, et al. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. Biochemistry 1989;28:2886–3894.
- Sirtori C, Zapata A, Malato A, Gernjak W, Fernández-Alba AR, Agüera A. Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. Photochem Photobiol Sci 2009;8:644–51.
- Sirtori C, Zapata A, Gernjak W, Malato A, Agüera A. Photolysis of flumequine: identification of the major phototransformation products and toxicity measures. Chemosphere 2012;88: 627–43.

#### C. Rodrigues-Silva et al. / Science of the Total Environment 445-446 (2013) 337-346

- Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Profumo A, Pretali L, Fasani E, et al. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials marbofloxacin and enrofloxacin. Chemosphere 2012;86:130–7.
  Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh QT, Clément M, et al. Occurrence and fate of
- Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, Eurin J, Dinh QT, Clément M, et al. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. Sci Total Environ 2008;393:84–95.
- Zu06;33:84–95.
  Tamtam F, van Oort F, Le Bot B, Dinh T, Mompelat S, Chevreuil M, et al. Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. Sci Total Environ 2011;409:540–7.
- Vasconcelos TG, Henriques DM, König A, Martins AF, Kümmerer K. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: identification and biodegradability assessment of the primary by-products. Chemosphere 2009;76:487–93. Villa R, Cagnardi P, Acocella F, Massi P, Anfossi P, Asta F, et al. Pharmacodynamics and
- Villa R, Cagnardi P, Acocella F, Massi P, Anfossi P, Asta F, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. Vet J 2005;170:101–7.

346

## 4.3 Degradação de flumequina por UV/TiO<sub>2</sub>

Artigo "Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity", publicado na revista Chemical Engineering Journal, volume 224, páginas 46 a 52, no ano de 2013. Este artigo corresponde as páginas 71 a 77 desta tese, e o material suplementar as páginas 78 a 81.

#### Chemical Engineering Journal 224 (2013) 46-52



#### Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

## Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity

#### Caio Rodrigues-Silva<sup>a</sup>, Milena Guedes Maniero<sup>a</sup>, Susanne Rath<sup>b</sup>, José Roberto Guimarães<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Civil Engineering, Architecture and Urbanism, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6021, 13083-852 Campinas, SP, Brazil <sup>b</sup> Chemistry Institute, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

#### HIGHLIGHTS

- ► UV/TiO<sub>2</sub> was able to degrade 98% of flumequine within 45 min.
- A total loss of antimicrobial activity was observed in 30 min.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition improved the degradation efficiency and biological activity reduction.
- ▶ Byproducts with *m*/*z* of 244, 234, 232, and 202 were identified.

#### ARTICLE INFO

Article history: Available online 17 November 2012

Keywords: AOP Byproducts Fluoroquinolones Veterinary drug TiO<sub>2</sub>

#### G R A P H I C A L A B S T R A C T



#### ABSTRACT

This study evaluated the efficiencies of advanced oxidation processes (UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for the flumequine degradation, an antimicrobial and emergent pollutant. The photocatalytic process was capable of degrading approximately 55% of the drug after 15 min of reaction using 0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> in suspension; the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mmol L<sup>-1</sup>) increased flumequine degradation to 81.6%. For UV/TiO<sub>2</sub>, increasing catalyst concentration (0.08–0.62 mmol L<sup>-1</sup>) corresponded to an increase in the degradation efficiency. Using mass spectrometry, it was possible to identify five putative byproducts formed during the advanced oxidation processes. Due to the risks of bacterial resistance, the antimicrobial activity of the treated solutions was evaluated and compared to an untreated solution. Residual antimicrobial activity was considerably reduced by the photocatalytic processes (UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) throughout the reaction.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Veterinary drugs are widely used in animals for infection control, prophylaxis and therapeutic uses [1]. The majority of these drugs are not fully metabolized by animals due to their low absorption in the digestive tract. Therefore, these drugs can be excreted *in natura* via feces and urine in their non-metabolized form or as active metabolites, thereby contaminating soils and surface waters [2].

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 2378. E-mail address: jorober@fec.unicamp.br (J.R. Guimarães). Flumequine, an antimicrobial agent of the fluoroquinolone family, is commonly used in veterinary medicine. Due to its continuous introduction into the environment and resistance to degradation, flumequine residues have been detected in aquatic environments  $(2.5-50 \text{ ng L}^{-1})$  [3–5], and in soil  $(6.9 \ \mu \text{g g}^{-1})$  [6]. When present in the environment, flumequine may cause alterations in microbial communities (e.g., the development of resistant bacteria) and can affect organisms. The presence of this drug in water and soil has attracted the attention and concern of the scientific community [3,7,8]. Veterinary drugs are also frequently released into the environment as a result of manufacturing processes, illegal disposal, metabolic excretion and accidental discharges during drug applications [9–11]. Several studies have reported the low efficiency of the

<sup>1385-8947/\$ -</sup> see front matter @ 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.002

removal of these compounds by water and sewage treatments plants [12–14].

Advanced oxidation processes (AOPs) present efficient mechanisms for the reduction of persistent substances. Among the commonly used AOPs, photocatalytic processes have been successfully used for the degradation of antimicrobial drugs in aqueous solutions [15–24]. TiO<sub>2</sub> is the most widely used photocatalyst due to its high stability, low cost, and low environmental impact [25].

In our previous study [26], flumequine in aqueous solutions was degraded by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas Miranda-García et al. [15], Paul et al. [17], Nieto et al. [20], Palominos et al. [22] and Mansilla et al. [24] used photocatalysis to degrade this fluoroquinolone. Despite the available literature regarding flumequine degradation by photocatalysis, reports of residual antimicrobial activity are rare. This evaluation is needed because even after the extensive degradation of the original compound, the generated byproducts may present antimicrobial activity. In the reports of Palominos et al. [22] and Mansilla et al. [24], irradiated solutions were examined in terms of their antimicrobial activity against *Escherichia coli* based on measurements of the inhibition halo formed around the micro drops seeded in bacteria-inoculated agar plates. However, these studies aimed to qualitatively or semi-quantitatively evaluate the antimicrobial activity.

The quantitative analysis of antimicrobial activity in degraded drug samples is seldom reported in the scientific literature. Paul et al. [18] studied modifications in the antibacterial potency of aqueous ciprofloxacin solutions during photocatalytic treatment processes. In our previous work [26], a reduction in antimicrobial activity was evaluated during flumequine degradation by photolysis, peroxidation and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This study is the first dedicated to the quantitative evaluation of residual antimicrobial activity of flumequine solutions submitted to UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes.

The objective of the present study was to evaluate the reduction in antimicrobial activity during flumequine degradation by photocatalysis with  $TiO_2$  in suspension. In addition, the influence of hydrogen peroxide additions was assessed, and the resulting degradation byproducts were investigated.

#### 2. Experimental

#### 2.1. Chemicals

Flumequine (99%) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The molecular formula and molecular weight of flumequine are C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub> and 261.25 g mol<sup>-1</sup>, respectively. Methanol (HPLC grade) and BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (99%) were purchased from J.T. Baker (Edo. de México, Mexico); oxalic acid (99.5%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany); hydrogen peroxide (30%, v/v), NaHSO<sub>3</sub> (58.5% of SO<sub>2</sub>), concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaOH (97%) were purchased from Synth (Diadema, Brazil); H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%) were purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil); KOH (85%) was purchased from Ecibra (São Paulo, Brazil); NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> (99%) was purchased from Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Germany); and TiO2 was obtained from Degussa (Frankfurt, Germany). Mueller-Hinton broth cultures and Mueller-Hinton:Agar were purchased from Himidia (Mumbai, India). Ultrapure water used throughout the study was obtained using a Milli-Q Academic water purification system (Millipore).

#### 2.2. Stock solution

A flumequine stock solution (250 mg  $L^{-1}$ ) was prepared in methanol and stored at 4 °C while protected from light. Flumequ-

ine working solutions (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) were prepared daily by appropriate dilutions of the stock solution in 1000 mL of ultrapure water.

#### 2.3. Experimental setup

AOP studies were performed using a previously described system [26], which was composed of a reactor (made of borosilicate glass with a 3.5 cm inner diameter and a 38.5 cm length containing a concentric low-pressure mercury lamp operating at 15 W with  $\lambda_{max} = 254$  nm and a 2.4 cm inner diameter; 190 mL volume), a magnetic stirrer, a 1000 mL reservoir, and a peristaltic pump, to maintain the solution in constant recirculation. In this experimental system, the lamp was in direct contact with the circulating solution. The irradiance was 8.3 mW cm<sup>-2</sup>, as measured by a Cole Parmer (VLX 3 W model) radiometer previously calibrated at 254 nm.

Photocatalysis experiments were performed in an aqueous solution at pH 7. The concentration of the catalyst (TiO<sub>2</sub>, Degussa P-25), which was held in suspension by agitating the solution, varied from 0.08 to 1.88 mmol L<sup>-1</sup>. Following the degradation assays, titanium dioxide was removed by filtration with a GF 51-B glass membrane. In the UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added, and the reactions were stopped by the addition of so-dium bisulfite with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a 1:1 M ratio.

#### 2.4. TiO<sub>2</sub> adsorption test

The adsorption of flumequine was obtained in the dark. A total volume of 1 L of flumequine working solution (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) was maintained in the presence of different concentrations of TiO<sub>2</sub> (0.08, 0.62, and 1.88 mmol L<sup>-1</sup>) at pH 7 under agitation. The temperature was maintained at 25 °C. After the assays, TiO<sub>2</sub> was removed by filtration with a GF 51-B glass membrane. The aqueous solution with the remaining flumequine was then concentrated by solid phase extraction (SPE), and the extract was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

#### 2.5. Analytical methods

Flumequine degradation was evaluated by HPLC with UV detection. Sample preparation prior to quantification was performed by SPE. SPE was performed using a  $C_{18}$  solid phase cartridge (Varian 500 mg/6 mL) conditioned with methanol (6 mL) and water (6 mL). One liter of sample was percolated through the cartridges at a flow rate of 10 mL min<sup>-1</sup>. Subsequently, the sorbent was dried under vacuum, and the analyte was eluted with methanol (4.0 mL). The eluate was filtered (0.22 µm membrane filters) prior to HPLC analyses. The recovery ranged from 89% to 104% for samples containing flumequine in the concentration range of 50–500 µg L<sup>-1</sup>.

The chromatographic system consisted of a Waters solvent delivery system (model 510), a tunable absorbance detector (Waters model 486) and a Rheodyne 7725 injector with a 20  $\mu$ L sample loop. Quantitation was performed at 236 nm. An XBridge<sup>®</sup> RP18 column from Waters (250 mm × 4.6 mm I.D., 5  $\mu$ m) was used as the analytical column. The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Methanol:0.01 mol L<sup>-1</sup> oxalic acid (60:40 v/v) was used as the mobile phase. The LOD and LOQ were 0.24  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and 1.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectively.

#### 2.6. Identification of byproducts by mass spectrometry

To identify the byproducts formed during the degradation processes, aqueous solutions containing 5 mg L<sup>-1</sup> of flumequine were used to avoid the loss of byproducts during the concentration step. The photocatalytic processes were evaluated from 0 to 30 min using 0.16 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> and 5.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The detection and identification of byproducts formed during the advanced degradation processes were performed using a Micromass<sup>TM</sup> quadrupole (Q) time of flight (ToF) mass spectrometer (Waters, USA). Data processing was performed using MassLynx software (Waters, USA). Spectra were acquired between m/z 100 and 600. The typical operational conditions were as follows: cone gas flow (50 L h<sup>-1</sup>), desolvation gas flow (300 L h<sup>-1</sup>), polarity (ES+), capillary energy (1300 V), sample cone energy (35 V), extraction cone energy (5 V), desolvation temperature (250 °C), source temperature (150 °C), ionization energy (1 V), collision energy (10 V) and multi-channel plate detector energy (2700 V).

#### 2.7. Antimicrobial activity assay

First, a sample of *E. coli* K12 wild type (ATCC: 23716) in Mueller–Hinton-glycerol (60:40, v/v) solution was thawed at 25 °C. Then, 0.1 mL of this culture was inoculated in 10 mL of Mueller–Hinton broth, and the broth culture was incubated for 24 h at 37 °C on a shaker (100 rpm) (Marconi, model MA-420). The 24-h *E. coli* culture was diluted to match the absorbance of a McFarland stock solution (0.5 mL of 0.048 mol L<sup>-1</sup> BaCl<sub>2</sub> in 99.5 mL of 0.18 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at 630 nm. This absorbance corresponded to a population density of  $1.0 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. The antimicrobial activity was evaluated using the *E. coli* K12 culture at a population density of  $1.0 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>.

Antimicrobial activity assays were performed according to the method of Paul et al. [18] with certain modifications. The initial and degraded samples were first diluted 50-fold in 1.0 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 8). A 300  $\mu$ L aliquot of the 50 $\times$  diluted sample was added to the first well of each row of a 96-well microtiter plate, and 100  $\mu$ L of 1 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (pH 8) was added to all wells of the plate except the first well of each row. Subsequently, a 10-member 3:2 serial dilution (i.e., 1.5-fold) series was prepared from each sample across the corresponding row by dosing 200  $\mu$ L of the solution contained in the first well to the next well (2nd) and repeating this sequence until the 11th well. The last well (i.e., the 12th well) contained only the buffer solution. After the serial dilution, all wells of the row plate were then inoculated with 100 µL of E. coli K12 culture solution. The plate was sealed and incubated under 100 rpm (Marconi, model MA-420) agitation for 8 h at 37 °C. After incubation, the absorbance of each sample well was measured at 630 nm using a Multiskan MS microplate reader (Labsystems). The antimicrobial activities of the flumequine standards (control) as well as the initial (t = 0 min) and degraded (t = 15, 30, 45, 60 min) samples were quantified in duplicate using previously reported procedures [26].

Absorbance measurements were converted to growth inhibition values (%), *I*, according to the following equation:

$$I(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \tag{1}$$

where  $A_0$  is the absorbance of the phosphate buffer incubated with *E. coli* culture, and *A* refers to the absorbance of the sample incubated in each well; both absorbances were determined at 630 nm.

The dose–response curves and the  $EC_{50}$  (the effective dose at which 50% growth inhibition is achieved) values of the degraded and untreated solutions were evaluated using Graph-Pad Prism 5.0 software (La Jolla, CA, USA). The dose–response curves, which represent the relationship between the log serial dilution and the growth inhibition percentage (Eq. (1)), were evaluated using the following equation:

$$I(\%) = I_{\min,t} + \frac{I_{\max,t} - I_{\min,t}}{\left(1 + 10^{(\log EC_{5} - \log(\frac{1}{m^{H}})) \times H}\right)}$$
(2)

where  $I_{max,t}$  and  $I_{min,t}$  represent the maximum and minimum growth inhibition for each data sample, respectively; EC<sub>50</sub> is the

effective dose at which 50% growth inhibition is achieved; and H is the Hill slope for the experimental conditions.

#### 3. Results and discussion

#### 3.1. Adsorption of flumequine on TiO<sub>2</sub>

Experiments were performed to evaluate the adsorption of flumequine (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) onto TiO<sub>2</sub> surfaces at pH 7. The catalyst concentration ranged from 0.08 to 1.88 mmol L<sup>-1</sup>. Experiments were performed over the course of 90 min. Equilibrium was reached after 30 min. Thus, for the photocatalytic assays, flumequine solutions were initially placed in contact with TiO<sub>2</sub> for 30 min, and the UV lamp was turned on and the experiment started after this period.

The maximum extents of flumequine adsorptions on the catalyst surface were 10.2%, 20.8% and 29.6% when 0.08, 0.62, and 1.88 mmol  $L^{-1}$  TiO<sub>2</sub> were used, respectively. These results are consistent with those of Nieto et al. [20] and Palominos et al. [22]. Nieto et al. [20] verified that TiO<sub>2</sub> absorbed approximately 19% of the initial flumequine concentration (20 ppm) in 30 min at a pH of approximately 7.0. Palominos et al. [22] reported that the flumequine adsorption in the dark was approximately 27% at pH 6, and no further flumequine adsorption on titanium dioxide was observed after 30 min of contact.

#### 3.2. Flumequine degradation

In the present study, the tests were performed using a 15 W low pressure mercury lamp with a maximum emission at 254 nm to allow the comparison between the photocatalytic processes and our previous work (UV and  $UV/H_2O_2$ ) [26].

Photocatalysis was effective in removing flumequine from an aqueous solution. For all applied catalyst concentrations, the efficiency of the photocatalytic process was superior to that of photolysis (Fig. 1). As previously reported [26], approximately 80% of the flumequine was removed by photolysis after 45 min of reaction and the maximum observed extent of degradation was approximately 91% in 60 min. Using the same reactor and 0.62 mmol L<sup>-1</sup> of catalyst, the photocatalysis was able to remove approximately 98% and 99% of flumequine within 45 and 60 min, respectively.



Fig. 1. Flumequine degradation by UV and UV/TiO<sub>2</sub>.  $TiO_2$  concentrations vary from 0.08 to 1.88 mmol L<sup>-1</sup>. UV data were published by da Silva et al. [26].

An increase in the degradation efficiency was observed when the catalyst concentration was increased from 0.08 to 0.62 mmol L<sup>-1</sup>. This direct correlation between the degradation rate and the catalyst concentration is due to a larger number of active TiO<sub>2</sub> sites available for the photocatalytic reaction, as reported by Yang et al. [16] and Doll and Frimmel [27]. However, a further increase in the TiO<sub>2</sub> concentration greater than 0.62 mmol L<sup>-1</sup> did not produce a significant improvement in the drug degradation, which is consistent with studies by Elmolla and Chaudhuri [28], Hapeshi et al. [29] and Malato et al. [25]. According to Malato et al. [25], the increase in photodegradation with an increase in the catalyst concentration approaches a limiting value at high TiO<sub>2</sub> concentrations, and this limit depends on the total illumination of the TiO<sub>2</sub> particles; when the catalyst concentration is very high, turbidity hinders further penetration of light into the reactor. In our study, 0.62 mmol L<sup>-1</sup> was found to be the optimal catalyst concentration for flumequine degradation.

The results obtained in this study are consistent with those of Palominos et al. [22] and Mansilla et al. [24] who obtained more than 90% of flumequine degradation by photocatalysis with TiO<sub>2</sub>. By comparing the results obtained in this work with previously published data [26], it was verified that the flumequine degradation when using 0.62 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> in a photocatalysis reaction was similar to that obtained by da Silva et al. [26] for the degradation of this same drug by peroxidation assisted by ultraviolet radiation (1.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 3.2.1. Influence of $H_2O_2$ addition

An aliquot of  $0.5 \text{ mmol } L^{-1}$  of  $H_2O_2$  was added to the UV/TiO<sub>2</sub> process to evaluate its influence on the degradation efficiency. As shown in Fig. 2, the addition of  $H_2O_2$  promoted an increase in the flumequine degradation, especially during the first 15 min of the reaction.

When 0.08 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> was used in the UV/TiO<sub>2</sub> assays, 42% flumequine degradation was achieved in 15 min; the addition of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased the degradation efficiency to 77.4%. UV/TiO<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>) and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>) and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> and 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were capable of degrading 54.6% and 81.6% of the flumequine in 15 min, respectively. However, the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not result in a greater extent of degradation after 30 min. Additionally, after 60 min, greater than 98% flumequine degradation was observed for all evaluated conditions.



Fig. 2. Flumequine degradation by UV/ $H_2O_2$ , UV/ $TiO_2$  and UV/ $TiO_2/H_2O_2$  (0.5 mmol L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$ ). UV/ $H_2O_2$  data were published by da Silva et al. [26].

According to Chu et al. [30] and Elmolla and Chaudhuri [28], when a small amount of  $H_2O_2$  is added to the UV/TiO<sub>2</sub> process, an enhancement of the degradation rate occurs due to the increased generation of hydroxyl radicals by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In addition, due to the electron accepting nature of  $H_2O_2$ , it reacts with the electrons that are emitted from the valence band to generate hydroxyl radicals and OH<sup>-</sup>, as shown by the following equation [25,30]:

$$H_2O + e^- \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- \tag{3}$$

As has been reported [26], using 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 52% flumequine degradation was observed in 15 min of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process and the maximum degradation was 97.5% in 60 min. The photocatalytic process (UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) improved the efficiency of the process even at a low TiO<sub>2</sub> concentration. Using 0.08 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>, 77.5% drug degradation was verified in 15 min, and in 60 min it reached 99%. This enhancement can be explained by the higher OH generation in the photocatalytic process mainly due to the oxidation of H<sub>2</sub>O adsorbed in the semiconductor surface.

#### 3.3. Byproducts formed during flumequine degradation

The initial flumequine solution (Fig. SI1) and the solutions degraded by the UV/TiO<sub>2</sub> (Fig. SI2), UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. SI3), and UV (Fig. SI4) processes were monitored by mass spectrometry. The structures of possible byproducts were proposed (Table 1) based on the mass spectra (including the MS/MS analyses and isotopic distributions), the likely elemental composition (which was calculated considering only the elements of flumequine (C, H, O, N, and F)), and the organic reactions (which were drawn based on possible mechanisms for reaction between the OH radical with some fluoroquinolones and fragmentations of quinolones by photolysis [31–33]).

Significant amounts of five byproducts were identified in the solutions submitted to the AOPs: 5-methyl-1-oxo-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij] quinoline-2-carboxylic acid (m/z 244), 5-methyl-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-1,2,9-triol (m/z 234), 2,9-dihydroxy-5-methyl-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-1-one (m/z 232), 8-butylquinolin-4(1H)-one (m/z 202), and 5-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1ij]quinolin-1-one (m/z 202) (Figs. SI2 and SI3).

The compound with m/2 244 was identified in the samples submitted to UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at all evaluated reaction times. The byproduct with m/z 234 was identified only during the UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, while the compound with m/z 232 was detected just in the samples that underwent UV/TiO<sub>2</sub>. The intermediates with m/z 202 were detected in the UV/TiO<sub>2</sub> samples after 10 and 15 min of reaction; after this point, these compounds were present at smaller concentrations. However, for the UV/TiO<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, these compounds were observed just in the first 10 min of reaction.

The degradation of flumequine by photolysis produced two products in appreciable amounts, m/z 244 and 232 (Fig. SI4). The analyses and comparison between photolysis and AOPs processes (UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) suggests that the formation of these byproducts is dependent on the degradation process (with or without hydroxyl formation) and the reaction time such that the byproducts can undergo further degradation. It is also important to note that even after 60 min of reaction, flumequine continued to be identified in the degraded solutions, thereby confirming that the entire quantity of flumequine (500 µg) in a 1 L aqueous solution was not completely degraded.

According to Albini and Monti [31], the main photoreaction occurring under neutral conditions is defluorination of the fluoroquinolones followed by decarboxylation. Sirtori et al. [32] monitored the degradation of flumequine by photo-Fenton and photocatalysis reactions and verified that a large amount of

#### C. Rodrigues-Silva et al. / Chemical Engineering Journal 224 (2013) 46-52

#### 50

 Table 1

 Flumeguine and proposed byproducts.

Compound	m/z	Formula	Process		
			UV-C	UV/TiO <sub>2</sub>	UV/TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Flumequine	262	$C_{14}H_{12}FNO_3$			
5-Methyl-1-oxo-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-2-carboxylic acid	244	$C_{14}H_{13}NO_3$	~	~	~
OH HO S-Methyl-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-1,2,9-triol	234	$C_{13}H_{15}NO_3$	ND	ND	~
HO CH 2,9-Dihydroxy-5-methyl-6,7-dihydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-1-one	232	$C_{13}H_{13}NO_3$	~		-
8-Butylquinolin-4(1H)-one	202	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO	ND	La.	~
0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	202	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> NO	ND	~	20

ND - not detected.

fluorine was present as fluoride ( $F^-$ ). These studies support our proposed mechanism regarding the defluorination of the drug to produce a byproduct with m/z 244.

The hydroxylation of the flumequine molecule may also be considered because AOPs are based on HO<sup>•</sup> reactions, and HO<sup>•</sup> attack is not selective [32]. According to Giraldo et al. [33], the hydroxylation of compounds submitted to AOPs through photo-Kolbe reactions is well known, and the rapid decarboxylation of oxolinic acid (another quinolone) has been observed. The formation of the byproducts with m/z 234 and 232 likely occurred after successive attacks of flumequine molecules by HO<sup>•</sup>. Photo-Kolbe reactions took place followed by the substitution of the F<sup>-</sup> ions by OH<sup>-</sup>, thereby generating the compounds with m/z 234 and 232.

The mass spectra of the degraded solutions and MS/MS analysis of the compound with m/z 244 (Fig. SI2B) showed the presence of a compound with m/z 202, which indicates that the decarboxylation of the m/z 244 compound is a potential degradation pathway.

#### 3.4. Antimicrobial activity

Although the nearly complete degradation of flumequine was achieved by AOP, traces of flumequine were detectable by mass spectrometry after the process was ended.

EC<sub>50</sub> of flumequine was determined and was used as a control parameter; i.e., this concentration was compared to the EC<sub>50</sub> of the untreated samples (t = 0 min) to evaluate possible interferences. The *E. coli* culture was exposed to flumequine concentrations ranging from 1.25 mg L<sup>-1</sup> to 21.7 µg L<sup>-1</sup> to obtain the flumequine EC<sub>50</sub> varied from  $14.0 \times 10^{-5}$  to  $15.3 \times 10^{-5}$  g L<sup>-1</sup>. The median value ( $14.65 \times 10^{-5}$  g L<sup>-1</sup>) was assumed as the flumequine EC<sub>50</sub>. The relationship between the EC<sub>50</sub> of the untreated and degraded solutions was analyzed using the following equation:

 $PEQ = \frac{EC_{50,0}}{EC_{50,x}}$ (4)

where PEQ is the potency equivalent value,  $EC_{50,0}$  represents the effective dose at which 50% growth inhibition was observed in the untreated flumequine solution and  $EC_{50,x}$  is the  $EC_{50}$  value calculated for each degraded sample.

Fig. 3 shows the antimicrobial activities following UV/TiO<sub>2</sub> treatment. For all solutions degraded by UV/TiO<sub>2</sub> and UV/TiO<sub>2</sub>/ $H_2O_2$ , a total loss of antimicrobial activity was observed in 45 min of reaction. For the photolysis reaction, a complete loss of antimicrobial activity was observed after only 60 min of reaction, as previously reported [26]. When comparing the photolysis and UV/TiO<sub>2</sub> results, it is evident that the loss of antimicrobial activity was improved by the addition of TiO<sub>2</sub> even at a low catalyst concentration (0.16 mmol L<sup>-1</sup>).

For the UV/TiO<sub>2</sub> process, when 0.16 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> was used, an 89% reduction in the antimicrobial activity was observed after 30 min (Fig. 3A); for the other concentrations that were employed, no antimicrobial activity was observed after this same reaction time (results not shown). The antimicrobial activity reductions within the first 15 min were compared using different concentrations of TiO<sub>2</sub> (Fig. 3B). It was demonstrated that an increased in the TiO<sub>2</sub> concentration (from 0.16 to 1.88 mmol L<sup>-1</sup>) resulted in a progressive reduction in the antimicrobial activity (from 60% to 89.9%)

As previously discussed (Fig. 1), the maximum efficiency of the photocatalysis process was achieved when 0.62 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> or higher concentrations were used. The addition of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improved the extent of flumequine degradation in the assays performed with TiO<sub>2</sub> levels that were lower than the optimal concentration (0.62 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>) (Fig. 2). The same behavior was observed for the antimicrobial activity; i.e., the UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> and 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) process was capable of eliminating 91% of the antimicrobial activity within 15 min of reaction, whereas the UV/TiO<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> process reduced the activity by only 75% within the same reaction time. Additionally, it is important to highlight that the UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> and 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) treatment was



**Fig. 3.** Dose–response curves for flumequine degradation by (A) UV/TiO<sub>2</sub> (0.16 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>), and (B) UV/TiO<sub>2</sub> (0.16–1.88 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>) and UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> and 0.50 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 15 min reactions. All results are presented with 95% confidence limits as error bars in each graph.

more efficient in reducing the antimicrobial activity than was the  $UV/TiO_2$  process even when a high catalyst dose was used (1.88 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>).

In addition, it was observed that as the flumequine concentration decreased, the antimicrobial activity also decreased; this suggests that the antimicrobial activity of the treated solution is related to the residual flumequine concentrations rather than its byproducts.

The antimicrobial activity of flumequine is related to the formation of hydrogen bonds between the acceptor groups C=O, COOH and F of the molecule and the DNA gyrase, resulting in an inhibition the bacterial duplication [34]. Thus, the reduction in the antimicrobial activity could be related to the reactions in this domain. The identified byproducts may present lower antimicrobial activities than flumequine because they have shown modifications in the molecule bonding sites. It is also probable that once flumequine loses the fluoride ion (m/z 244), the bonding affinity with the DNA gyrase decreases, reducing its antimicrobial activity. The intermediates with m/z 234, 232, and 202 may not have antimicrobial activity due to the loss of the required 3-carboxyl group for quinolone activity.

Few papers have evaluated the antimicrobial activity of flumequine solutions degraded by AOPs. Palominos et al. [22] observed that after total flumequine degradation by photocatalysis, the antimicrobial activity of the solution was completely eliminated; in addition, after total flumequine degradation, 20% of the original total organic carbon (TOC) remained in the solution, showing that the oxidized products formed during degrada tion were not biologically active against the selected bacteria. Mansilla et al. [24] also reported that a total elimination of the antimicrobial activity was observed in solutions treated by photocatalysis (with immobilized TiO<sub>2</sub> or in suspension). The results obtained in this work also corroborate the data of da Silva et al. [26], who reported a total elimination of the antimicrobial activity of a flumequine solution degraded by  $UV/H_2O_2$  (1.0 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### 4. Conclusion

 $UV/TiO_2$  and  $UV/TiO_2/H_2O_2$  were effective for the degradation of flumequine in aqueous solutions and the reduction of the antimicrobial activity of the solutions. A direct relationship between the extent of flumequine degradation and changes in the biological activity was observed.

The optimal concentration of catalyst in the UV/TiO<sub>2</sub> treatment was 0.62 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>. Under this condition, 83.5% of the drug was degraded within 15 min of reaction, and a 93.7% reduction was achieved within 30 min. An improvement in the extent of flumequine degradation was achieved with the addition of 0.5 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Five byproducts were identified: a compound with an m/z of 244 derived from a defluorination reaction, the compounds with m/z of 234 and 232 that resulted from the hydroxylation of the flumequine molecule through photo-Kolbe reactions, and two compounds with an m/z of 202, which were formed by decarboxylation and defluorination reactions.

A progressive reduction in the antimicrobial activity (60–90%) was clearly observed after 15 min of reaction by UV/TiO<sub>2</sub> when the catalyst concentration was varied from 0.16 to 1.88 mmol L<sup>-1</sup>. The antimicrobial activity was completely eliminated after 30 min when 0.62 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> was used. Finally, the UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment was more efficient in the removal of the antimicrobial activity than was UV/TiO<sub>2</sub>. The obtained results provide relevant information regarding the effectiveness of photocatalytic processes not only for the degradation of flumequine but also for the reduction of the antimicrobial activity.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge CAPES for providing scholarships to M.G. Maniero (PNPD0233080) and C. Rodrigues-Silva as well as FAPESP for financial support (2008/06470-0).

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.002.

#### References

- R. Galarini, L. Fioroni, F. Angelucci, G.R. Tovo, E. Cristofani, Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8158–8164.
- [2] P.K. Jjemba, Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment, Ecotoxicol. Environ. Safety 63 (2006) 113–130.
- [3] F. Tamtam, F. Mercier, B. Le Bot, J. Eurin, Q.T. Dinh, M. Člément, M. Chevreuil, Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions, Sci. Total Environ. 393 (2008) 84–95.
   [4] Z. Ye, H.S. Weinberg, M.T. Meyer, Trace analysis of trimethoprim and
- Z. Ye, H.S. Weinberg, M.T. Meyer, Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 79 (2007) 1135–1144.
   O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibánez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F.
- [5] O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibanez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid

chromatography/tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1103 (2006) 83-93

- [6] F. Tamtam, F. van Oort, B. Le Bot, T. Dinh, S. Mompelat, M. Chevreuil, I. Lamy, M. Thiry, Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation, Sci. Total Environ. 409 (2011) 540–547.
- [7] N. Kemper, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, Ecol. Indicator 8 (2008) 1–13.
  [8] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment, Crit. Rev. Toxicol. 34 (2004) 335–350.
- [9] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment a review Part I, Chemosphere 75 (2009) 417–434.
- [10] M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments, Talanta 69 (2006) 334–342. [11] M.S. Diaz-Cruz, M.J.L. Alda, D. Barceló, Environmental behavior and analysis of
- veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 340-351.17.
- [12] A.Y.C. Lin, T-H. Yu, S.K. Lateef, Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan, J. Hazard. Mater. 167 (2009) 1163-1169.
- A. Gulkowska, H.W. Leung, M.K. So, S. Taniyasu, N. Yamashita, L.W.Y. Yeung, B.J. Richardson, A.P. Lei, J.P. Giesy, P.K.S. Lam, Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China, the result of the second se [13] Water Res 42 (2008) 395-403.
- [14] A.L. Batt, S. Kim, D.S. Aga, Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations,
- Chemosphere 68 (2007) 428–435.
   [15] N. Miranda-García, S. Suárez, B. Sánchez, J.M. Coronado, S. Malato, M.I. Maldonado, Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO<sub>2</sub> in a solar pilot plant, Appl. Catal. B: Environ. 103 (2011) 294-301
- 301.
  [16] H. Yang, G. Li, T. An, Y. Gao, J. Fu, Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub>: a case of sulfa drugs, Catal. Today 153 (2010) 200–207.
  [17] T. Paul, P.L. Miller, T.J. Strathmann, Visible-light-mediated TiO<sub>2</sub> photocatalysis of fluoroquinolone antibacterial agents, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 4720– 4737.
- 4727
- [18] T. Paul, M.C. Dodd, T.J. Strathmann, Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity, Water Res. 44 (2010) 3121–3132.
- [19] H.-S. Son, G. Ko, K.-D. Zoh, Kinetics and mechanism of photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis of triclosan, J. Hazard. Mater. 166 (2009) 954–960.

- [20] J. Nieto, J. Freer, D. Contreras, R.J. Candal, E.E. Sileo, H.D. Mansilla, Photocatalyzed degradation of flumequine by doped  $TiO_2$  and simulated solar light, J. Hazard. Mater. 155 (2008) 45–50. A. Chatzitakis, C. Berberidou, I. Paspaltsis, G. Kyriakou, T. Sklaviadis, I. Poulios,
- Photocatalytic degradation and drug activity reduction of chloramphenicol, Water Res. 42 (2008) 386-394.
- R. Palominos, J. Freer, M.A. Mondaca, H.D. Mansilla, Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 193 (2008) 139–145. [22]
- L. Hu, P.M. Flanders, P.L. Miller, T.J. Strathmann, Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO2 photocatalysis, Water Res. 41 (2007) 2612-2626
- H.D. Mansilla, A. Mora, C. Pincheira, M.A. Mondaca, P.D. Marcato, N. Durán, J. [24] Freer, New photocatalytic reactor with TiO<sub>2</sub> coating on sintered glass cylinders, Appl. Catal. B: Environ. 76 (2007) 57–63.
- [25] S. Matlato, P. Fernández-Ibánez, M.I. Maldonado, J. Blanco, W. Gernjak, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends, Catal. Today 147 (2009) 1–59.
   [26] C.R. da Silva, M.G. Maniero, J.R. Guimarães, S. Rath, Antibacterial activity
- inhibition after the degradation of flumequine by UV/H\_2O\_2, J. Adv. Oxid. Technol. 14 (2011) 106–114.
- T.E. Doll, F.H. Frimmel, Removal of selected persistent organic pollutants by [27] heterogeneous photocatalysis in water, Catal. Today 101 (2005) 195–202. [28] E.S. Elmolla, M. Chaudhuri, Photocatalytic degradation of amoxicillin,
- ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalysis, Desalination 252 (2010) 46–52.
- E. Hapeshi, A. Achilleos, M.I. Vasquez, C. Michael, N.P. Xekoukoulotakis, D. Mantzavinos, D. Kassinos, Drugs degrading photocatalytically: kinetics and [29] mechanisms of ofloxacin and atenolol removal on titania suspensions, Water Res. 44 (2010) 1737-1746.
- [30] W. Chu, W.K. Choy, T.Y. So, The effect of solution pH and peroxide in the TiO<sub>2</sub>induced photocatalysis of chlorinated aniline, J. Hazard. Mater. 141 (2007) 86-91.
- A. Albini, S. Monti, Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones, [31] Chem. Soc. Rev. 32 (2003) 238-250.
- [32]
- Chem. Soc. Rev. 32 (2003) 238–250. C. Sirtori, A. Zapata, S. Malato, W. Gernjak, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation, Photochem. Photobiol. Sci. 8 (2009) 644–651. A.L. Giraldo, G.A. Penuela, R.A. Torres-Palma, N.J. Pino, R.A. Palominos, H.D. Mansilla, Degradation of the antibiotic oxolinic acid by photocatalysis with TiO<sub>2</sub> in suspension, Water Res. 44 (2010) 5158–5167. [33]
- LL, Shen, LA, Mitscher, P.N. Sharma, TJ, O'Donnell, D.W.T. Chu, C.S. Cooper, T. Rosen, A.G. Pernett, Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model, Biochemistry 28 (1999) 2005, 2004. [34] (1989) 3886–3894.

### 4.3.1 Material suplementar

### Degradation of Flumequine by Photocatalysis and Evaluation of Antimicrobial Activity

Caio Rodrigues-Silva<sup>1</sup>, Milena Guedes Maniero<sup>1</sup>, Susanne Rath<sup>2</sup>, and José Roberto Guimarães<sup>\*,1</sup> <sup>1</sup>School of Civil Engineering, Architecture and Urbanism, University of Campinas – UNICAMP

- P.O. Box 6021, 13083-852 - Campinas, SP, Brazil,

\*e-mail address: jorober@fec.unicamp.br

<sup>2</sup>Chemistry Institute, University of Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6154,

13084-971 - Campinas, SP, Brazil

### **Supplementary Information**

The degradation products were identified by structure elucidation with accurate mass measurements using ESI-QToF-MS for the confirmation of the molecular ions and the CID fragments. The likely elemental composition was calculated with a tool included in the ACD/ChemSketch software considering only the elements of flumequine (C, H, O, N, and F). Finally, the isotopic pattern suggestion was included and organic reaction proposals were drawn in order to explain specific fragments.



Figure SI1. (A) Mass spectra, (B) MS/MS, and (C) the structure of flumequine.

UV/TiO<sub>2</sub> (0.16 mmol  $L^{-1}$  TiO<sub>2</sub>): reaction time 10 min



Figure SI2. Mass spectra of flumequine solution submitted to photocatalysis at (A) 10 min and (C) 15 min of reaction. (B) MS/MS of the byproduct with m/z 244.



## 

Figure SI3. Mass spectra of flumequine solution submitted to UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at (A) 10 min and (B) 15 min of reaction.



min of reaction.

# 4.4 Degradação de flumequina pelos processos eletroquímico e foto-eletroquímico

Os resultados dos processos eletroquímico e foto-eletroquímico serão apresentados na forma de artigo científico - "Aplicação dos processos eletroquímico e foto-eletroquímico na degradação de flumequina" - o qual será submetido à revista Química Nova. Este artigo corresponde as páginas 83 a 96 desta tese.

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA RESIDUAL EM SOLUÇÕES DE FLUMEQUINA SUBMETIDAS AOS PROCESSOS ELETROQUÍMICO E FOTO-ELETROQUÍMICO

Caio Rodrigues-Silva<sup>1</sup>, Milena Guedes Maniero<sup>1</sup>, Susanne Rath<sup>2</sup>, and José Roberto Guimarães<sup>\*,1</sup> <sup>1</sup>Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade de Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6021, 13083-852 – Campinas, SP, Brasil, <sup>\*</sup>e-mail: jorober@fec.unicamp.br <sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade de Campinas – UNICAMP – P.O. Box 6154, 13084-971 – Campinas, SP, Brasil

#### **Resumo:**

RESIDUAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION IN FLUMEQUINE SOLUTIONS SUBJECTED TO ELECTROCHEMICAL AND FOTO-ELECTROCHEMICAL PROCESSES. This study evaluated the flumequine degradation and monitored the residual antimicrobial activity of the solutions subjected to electrochemical and photo-electrochemical processes. The photo-electrochemical process ( $J = 45 \text{ mA cm}^{-2}$ ) degraded 85% of the flumequine, concomitantly reducing 100% of the solution antimicrobial activity, after 60 min of reaction. The electrochemical process, under the same conditions, degraded 83% of the quinolone and reduced 92.7% of the antimicrobial activity in the solution. The residual antimicrobial activity decreased as the flumequine degradation increased in the solution submitted to both processes.

Keywords: antimicrobrial activity, fluoroquinolone, advanced oxidation process.
# 1. INTRODUÇÃO

A presença de poluentes orgânicos emergentes, tem sido relatada pela comunidade científica em águas superficiais,<sup>1</sup> esgoto municipal e,<sup>2</sup> inclusive, em água potável clorada destinada ao abastecimento público.<sup>3</sup> Poluentes orgânicos emergentes são definidos como compostos que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam potencial risco à saúde humana e ao meio ambiente.<sup>4</sup>

Dentre os principais riscos da presença de poluentes emergentes no ambiente destaca-se a preocupação com o desenvolvimento de bactérias resistentes. Bactérias expostas a resíduos de antimicrobianos podem sofrer modificações em sua carga genética, resultando na resistência do microrganismo ao antimicrobiano ao qual foi exposto.<sup>5</sup> Esses compostos oferecem, inclusive, riscos para espécies não-alvo, por sua toxicidade, pela possibilidade de bioacumulação e por possíveis efeitos ecotoxicológicos ainda pouco conhecidos.

Resíduos de fluoroquinolonas já foram detectados em efluentes hospitalares (44  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) demonstrando o potencial de dispersão dessa classe de antimicrobianos.<sup>5</sup> Dentre as fluoroquinolonas, a flumequina tem sido administrada como medicamento veterinário para combater principalmente bactérias gram-negativas, como por exemplo *E. coli*.

Tem sido reportado o emprego de processos oxidativos avançados (POA) como possíveis métodos para a degradação de poluentes emergentes, dentre eles, inclusive, a flumequina.<sup>7-9</sup> Os POA podem ser definidos como processos baseados na formação do radical hidroxila, o qual possui um potencial de redução elevado (E = 2,8 V)<sup>10</sup>. Os POA eletroquímico (POAE) e foto-eletroquímico (POAFE) são eficientes na degradação de compostos orgânicos recalcitrantes.<sup>11-13</sup> São escassos, porém, os trabalhos que avaliam a degradação das quinolonas no meio aquoso por esses processos.<sup>14,15</sup>

Dos processos eletroquímicos, os que empregam oxidação anódica são os mais comumente usados para a remoção de compostos orgânicos em baixas concentrações. Durante o processo, não só pode ocorrer a troca direta de elétrons entre o composto orgânico e a superfície do eletrodo, mas também a troca indireta, pela intermediação de espécies eletroativas oxidantes formadas no anodo.<sup>15</sup> Fukunaga<sup>11</sup> destacou a eficiência dos eletrodos metálicos de Ti revestidos com óxidos nobres, conhecidos como DSA<sup>®</sup> (Dimensionally Stable Anode), no tratamento de efluentes contaminados com formaldeído. Os radicais hidroxila são formados nesses processos durante a eletrólise. A descarga de água na superfície do anodo, representado por MO<sub>x</sub> nas

equações 1 e 2, forma radicais hidroxila fisicamente adsorvidos.<sup>11,15</sup>. Guinea *et* al.<sup>14</sup> observaram que a soma da densidade de corrente com a iluminação da superfície semicondutora aumentou a degradação da enrofloxacina de 30% para 100%, em apenas 10 min de reação.

$$\begin{array}{ll} MO_{x} + H_{2}O \rightarrow MO_{x}(^{\bullet}OH) + H^{+} + e^{-} & Equação (1) \\ MO_{x} + (OH^{-}) \rightarrow MO_{x}(^{\bullet}OH) + e^{-} & Equação (2) \end{array}$$

O objetivo desse trabalho foi monitorar a concentração da flumequina e a atividade antimicrobiana das soluções de flumequina submetidas aos processos POAE e POAFE. Além disso, os espectros de massa foram avaliados para identificação dos produtos de degradação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. Reagentes e soluções

Flumequina (99%), foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich, metanol (grau HPLC) e BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (99%) da J. T. Baker, ácido oxálico (99.5%) da Merck, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%) da Nuclear e KOH (85%) da Ecibra. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, NaOH (97%) e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram adquiridos da Synth. Caldo de cultura Mueller-Hinton e Mueller-Hinton/Agar foram supridos pela Himidia. A água ultrapura utilizada no estudo foi obtida por um sistema Millipore (Milli-Q Academic water purification system). A solução aquosa de trabalho (500 µg L<sup>-1</sup> de flumequina) foi preparada a partir da diluição da solução estoque (250 mg L<sup>-1</sup>) em água ultrapura (Milli-Q).

#### 2.2. Sistema experimental

Os processos de degradação eletroquímico e foto-eletroquímico foram realizados em um reator foto-eletroquímico similar ao descrito por Fukunaga.<sup>9</sup> O sistema experimental utilizado para a degradação da flumequina era constituído de um reator de vidro (capacidade de 1,2 L) e de uma bomba peristáltica para manter a solução em constante recirculação e agitação. O anodo possuía a composição de óxidos na proporção 70TiO<sub>2</sub>/30RuO<sub>2</sub> (DSA<sup>®</sup>, comercial de titânio revestido) com área de 200 cm<sup>2</sup>, fornecido por De Nora do Brasil. Uma tela de TiO<sub>2</sub> na forma metálica (catodo) foi fixada no interior do cilindro do anodo, mantendo-se um espaçamento de 3,0 mm. Por fim, um tubo de quartzo foi inserido concentricamente ao catodo, para servir de suporte para a lâmpada utilizada nos experimentos (UV-C germicida de 11 W e 80 W). Na Figura 1 é apresentado o esquema do sistema foto-eletroquímico.



**Figura 1.** Sistema operacional do reator foto-eletroquímico: 1 - Tubo de quatzo; 2 – Catodo; 3 – Anodo; 4 - Reservatório de 1,2 L; 5 – Bomba peristáltica.

A degradação da flumequina foi avaliada em diferentes tempos de reação (0 a 60 min). A densidade da corrente foi variada de 0 a 45 mA cm<sup>-2</sup>. Como eletrólito suporte foi utilizado  $K_2SO_4$  em duas concentrações diferentes, 0,05 e 0,025 mol L<sup>-1</sup>.

#### 2.3. Método Analítico

O método analítico utilizado para determinação da flumequina consistiu na concentração do analito por extração em fase sólida (EFS), e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção na região do UV-visível. Para a EFS, foi utilizado o cartucho  $C_{18}$  (500 mg/6 mL) da Varian, o qual foi condicionado com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. Após a percolação da amostra (1000 mL) a flumequina e os produtos de degradação foram eluídos com 4 mL de metanol. O cromatógrafo a líquido de alta eficiência utilizado no desenvolvimento deste trabalho era composto por um sistema de bombeamento unitário modelo Waters 510 (Waters, EUA). injetor modelo 7725 (Rheodyne, EUA), amostrador de 20  $\mu$ L e detector UV modelo 486 (Waters, EUA). A quantificação foi realizada em 236 nm. Para a aquisição dos dados foi utilizado um integrador modelo 746 (Waters, EUA). A coluna analítica utilizada para a separação foi a XBrige<sup>TM</sup> RP18 da Waters (250 mm x 4,6 mm DI, 5  $\mu$ m). A fase

móvel foi constituída por metanol e 0,01 mol  $L^{-1}$  ácido oxálico (60:40, v/v). A vazão foi de 1 mL min<sup>-1</sup>. Os espectros UV-visível das amostras foram obtidos em um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1601 PC), usando uma cubeta de quartzo.

## 2.4. Atividade Antimicrobiana

O monitoramento da atividade antimicrobiana nas soluções submetidas aos POA foi feito por meio da avaliação da inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* K12 na presença das soluções serialmente diluídas, utilizando-se microplacas de 96 canais, conforme metodologia descrita por da Silva *et al.*<sup>9</sup>, Rodrigues-Silva *et al.*<sup>16</sup> e Rodrigues-Silva *et al.*<sup>17</sup>.

#### 2.5. Identificação de Intermediários

Os intermediários de degradação formados foram avaliados por meio de ensaios de espectrometria de massa, massas em tandem (MS/MS) e pela avaliação do perfil isotópico dos intermediários propostos. As estruturas dos possíveis produtos formados foram propostas baseadas nos espectros de massas, composição elementar do fármaco e mecanismos de reações apresentados na literatura especializada. A estrutura e composição química dos intermediários propostos foram calculadas com o software ChemDoodle v.4.1.1.

Os produtos de degradação formados foram investigados em soluções de 10 mg  $L^{-1}$  de flumequina submetidas à degradação. Essa técnica foi utilizada para intensificar o sinal dos produtos de degradação e para evitar a perda dos mesmos na etapa de EFS.

Nesse trabalho foi utilizado um espectrômetro de massas UHPLC-MS/MS Waters UPLC Acquity – TQD Quattro Micro API. A condição típica de operação foi: fluxo de gás no cone (100 L h<sup>-1</sup>), fluxo do gás de dessolvatação (800 L h<sup>-1</sup>), polaridade (ES +), energia do capilar (3.000 V), energia do cone (25 V), energia do cone de extração (3 V), temperatura de dessolvatação (300 °C), energia de ionização (0,5 V). O espectro foi adquirido entre m/z 100 e 600. O espectro foi adquirido entre m/z 100 e 600.

## **3. RESULTADOS**

Experimentos envolvendo a degradação de flumequina (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) pelos processos fotólise e fotocatálise heterogênea com TiO<sub>2</sub> imobilizado foram avaliados isoladamente para melhor da compreensão da contribuição desses processos nos ensaios envolvendo os radicais hidroxila. Utilizando uma lâmpada UV<sub>254 nm</sub> com 11W de potência, atingiu-se a degradação

máxima da flumequina em solução aquosa de 26,2%, em 60 min de ensaio. Ao aumentar a potência da lâmpada em aproximadamente 7 vezes ( $UV_{254\ 80W}$ ), a eficiência do processo fotólise aumentou para 39% após 60 min de ensaio. A fotocatálise heterogênea como o TiO<sub>2</sub> não apresentou resultados de degradação superiores à fotólise, independente da potência da lâmpada utilizada mesmo após 60 min de reação (Figura 2).

Duas concentrações de  $K_2SO_4$  foram avaliadas (0,025 e 0,05 mol L<sup>-1</sup>) como eletrólito suporte durante os processos eletroquímico e foto-eletroquímico, para manter a condutividade na solução durante os ensaios de degradação. Observou-se que quando empregado 0,025 mol L<sup>-1</sup> de  $K_2SO_4$ , a eficiência do processo de degradação aumentou, tanto no processo POAE como no processo POAFE (Figura 3).



**Figura 2.** Degradação de flumequina por fotólise (11 e 80 W) e fotocatálise heterogênea com TiO<sub>2</sub> imobilizado.

Na Figura 4 são apresentados os resultados da degradação das soluções submetidas aos processos POAE e POAFE, aplicando 0,025 mol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte. Para o processo POAE, avaliando os primeiros 15 min de reação, observou-se que a elevação gradual da densidade de corrente (15 até 30 mA cm<sup>-2</sup>) promoveu um aumento progressivo na degradação de flumequina de 21% para 39%. Porém aumentos subsequentes na densidade de corrente (37,5 a 45 mA cm<sup>-2</sup>) não resultaram em uma maior eficiência de degradação.



**Figura 3.** Degradação de flumequina pelo processo eletroquímico e foto-eletroquímico empregando K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte



**Figura 4**. Degradação de flumequina pelos processos eletroquímico (A) e foto-eletroquímico (B), empregando 0,025 mol  $L^{-1}$  de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte, UV<sub>254</sub> 11W e variando a densidade da corrente entre 0 e 45 mA cm<sup>-2</sup>.

O emprego da radiação  $UV_{254}$  no processo POAE resultou no aumento da eficiência da degradação da flumequina em solução aquosa, quando empregadas densidades de corrente menores que 30 mA cm<sup>-2</sup>. Entretanto, subsequentes aumentos na densidade da corrente não promoveram significativo ganho de eficiência em relação aos resultados obtidos nessas mesmas condições utilizando-se o processo POAE isoladamente (Figuras 4A e 4B). O processo POAFE promoveu a degradação máxima de 85% da flumequina em solução aquosa quando aplicado uma densidade de corrente de 45 mA cm<sup>-2</sup> e 60 min de reação.

Não existem na literatura dados sobre a degradação de flumequina pelos processos eletroquímico e foto-eletroquímico. No entanto, esses processos oxidativos avançados já foram empregados na degradação de outros antimicrobianos, inclusive quinolonas como ofloxacina e enrofloxacina. Jara *et al.*<sup>18</sup> avaliaram a degradação da ofloxacina (25 mg L<sup>-1</sup>) polo processo foto-eletroquímico (Ti/Pt, DSA<sup>®</sup>, usando 0,04 mol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte) e comprovaram que ao aplicar uma densidade de corrente elétrica na faixa de 200 A m<sup>-2</sup>, obtiveram 60% de degradação da fluoroquinolona, após 100 min de reação. Guinea *et al.*<sup>14</sup> avaliaram a degradação da enrofloxacina (150 mg L<sup>-1</sup>) em solução aquosa, empregando como anodo Pt e o eletrodo de diamante dopado com boro BDD ("boron-doped diamond") junto a uma densidade de corrente estável em 500 mA cm<sup>-2</sup>, e constataram que menos de 30% da fluoroquinolona foi degradação da sulfametazolina (1,3 mmol L<sup>-1</sup>), um antimicrobiano da família das sulfonamidas, utilizando como catodo o BDD e aplicando uma densidade de corrente de 30 mA cm<sup>-2</sup>, onde observaram a remoção de 50% do fármaco após 60 min de ensaio.

#### 3.1 Intermediários formados

A avaliação dos intermediários da degradação da flumequina já foi previamente discutida e analisada para os processos oxidativos avançados UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotocatálise e reagente de Fenton e foto-Fenton.<sup>16,17,20,21</sup> Entretanto, não há relatos de investigações da degradação de flumequina em soluções submetidas aos processos eletroquímico e foto-eletroquímico. Nas Figuras 5 e 6 são apresentados os espectros de massa obtidos para as soluções submetidas à degradação pelo processo eletroquímico.

De acordo com Albini e Monti<sup>22</sup> a perda do flúor é uma das principais rotas de degradação das quinolonas quando submetidas a radiação UV, tendo sido, inclusive, o aumento da concentração de fluoreto em soluções de flumequina submetidas aos POA reportado por Klamerth *et al.*<sup>23</sup> e Sirtori *et al.*, 2012.<sup>21</sup> Dessa forma, é possível propor que o radical hidroxila gerado nesses processos possa ter promovido a formação do produto *m/z* 244 (5-metil-1-oxo-6,7-dihidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]quinolina-2-ácido carboxílico), pelo processo de perda do flúor da molécula da flumequina. A identificação do produto de degradação com *m/z* 244 corrobora com os estudos de Rodrigues-Silva *et al.*<sup>16,17</sup>.



Figura 5. Espectro de massa das soluções submetidas à degradação pelo processo eletroquímico (30 mA cm<sup>-2</sup>) nos tempos de degradação: (D) t = 15 min, (C) t = 30 min, (B) t = 45 min e (A) t = 60 min.



A identificação dos demais produtos da degradação, apresentados nos espectros de massa das Figuras 5 e 6, é complexa, tendo em vista a possibilidade de formação de adutos entre os fragmentos e o K<sup>+</sup>, devido ao excesso de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em relação à concentração de flumequina. Adutos são íons formados pela combinação direta entre a molécula ionizada e outro íon que não seja um próton (H<sup>+</sup>), e não se fragmentam quando empregada energia de ionização em análise de massa em tandem.<sup>24</sup> Os produtos formados com *m/z* 217, 213, 197 e 175 presentes com um sinal intenso nos espectros de massa das Figuras 5 e 6, não puderam ser identificados e propostos, pois não foi possível avaliar a fragmentação desses analitos por análises de MS/MS. Presume-se que, provavelmente, isso ocorra por esses serem adutos dos intermediários da degradação com potássio.

#### 3.2 Remoção da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da flumequina está relacionada com a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aceptores (COOH, C=O e F) com o DNA-girase, resultando na inibição da duplicação da bactéria. Uma vez que ocorram alterações nos sítios onde se formam as ligações de hidrogênio, espera-se que a atividade antimicrobiana do intermediário formado diminua. Porém, as reações entre os radicas hidroxila e as quinolonas não são totalmente identificáveis, uma vez que o radical hidroxila não é seletivo, podendo entrar em contato em qualquer região da molécula alvo. Dessa forma, não é totalmente claro o caráter antimicrobiano dos intermediários formados durante a aplicação de um POA, sendo imprescindível, portanto, a investigação da atividade antimicrobiana residual da solução.

O CE<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir o crescimento de 50% da população) da flumequina foi avaliado e utilizado como um parâmetro de controle comparativo entre as amostras não submetidas (t = 0 min) ao processo eletroquímico e foto-eletroquímico, para avaliar possíveis interferentes. A cultura de *E. coli* foi exposta a concentrações de flumequina entre 1,25 mg L<sup>-1</sup> e 21,7  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. O valor de CE<sub>50</sub> assumido para a flumequina foi de 14,65 x 10<sup>-5</sup> g L<sup>-1</sup>, baseado na média de 10 ensaios realizados em duplicata em 10 diferentes dias.

Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana foram comparados aos das curvas de dose resposta para o padrão da flumequina e para a solução inicial não degradada (t = 0 min). As atividades antimicrobianas residuais das soluções submetidas aos processos eletroquímico e foto-eletroquímico foram avaliadas em três condições diferentes, aplicando 15, 30 e 45 mA cm<sup>-2</sup>

de densidade de corrente e mantendo 0,025 mol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte. Nenhuma dessas condições avaliadas no processo eletroquímico promoveu a total degradação e remoção da atividade antimicrobiana da solução. Entretanto, observou-se uma redução gradativa da atividade antimicrobiana quando aumentando o tempo de reação e a densidade de corrente. A atividade antimicrobiana da solução reduziu 44,7, 70,6 e 83,5% quando aplicados 15, 30 e 45 mA cm<sup>-2</sup>, respectivamente, após 45 min de reação. A máxima remoção da atividade antimicrobiana observada para o processo POAE foi de 92,7%, quando aplicados 45 mA cm<sup>-2</sup> (Figura 7).

No processo foto-eletroquímico foi observado, diferentemente do processo eletroquímico, a total remoção da atividade antimicrobiana das soluções submetidas ao tratamento. A atividade antimicrobiana foi reduzida em aproximadamente 95% e 100%, após 45 e 60 min de reação, respectivamente, quando aplicados 45 mA cm<sup>-2</sup> (Figura 7). Os produtos de degradação já identificados e reportados na literatura e neste trabalho provavelmente apresentam atividade antimicrobiana inferior à flumequina.<sup>16,17</sup> Quando a molécula de flumequina perde o flúor ligante no C-6, a afinidade com o DNA-girase diminui, assim como a atividade antimicrobiana do composto (*m/z* 244).

Poucos trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana residual, de forma quantitativa, de soluções de flumequina submetidas a degradação por processos que envolvam o radical hidroxila.<sup>16,17</sup> Os resultados de remoção da atividade antimicrobiana obtidos nesse trabalho corroboram com os trabalhos já publicados de Da Silva *et* al.<sup>9</sup> e Rodrigues-Silva *et al.*<sup>16,17</sup>

Da Silva e colaboradores constataram a total remoção da atividade antimicrobiana em soluções de flumequina (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) submetidas ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C<sub>H2O2 inicial</sub> = 1 mmol L<sup>-1</sup> e 45 min de ensaio).<sup>9</sup> Rodrigues-Silva *et al.*<sup>17</sup> não observaram atividade antimicrobiana residual em soluções de flumequina submetidas ao processo foto-Fenton (C<sub>H2O2 inicial</sub> = 10 mmol L<sup>-1</sup>, C<sub>H2O2 inicial</sub> = 0,25 mmol L<sup>-1</sup>, C<sub>flumequina inicial</sub> = 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) após 15 min de ensaio. Rodrigues-Silva *et al.*<sup>16</sup> também reportaram a remoção da atividade antimicrobiana em soluções (C<sub>flumequina inicial</sub> = 500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) submetidas ao processo fotocatálise com TiO<sub>2</sub> em suspensão. Observaram que aumentando a concentração do semicondutor entre 0,16 e 0,94 mmol L<sup>-1</sup> a atividade antimicrobiana decaiu gradativamente na solução, após 15 min de ensaio. A total remoção da atividade antimicrobiana foi observada após 30 min de ensaio e 0,31 mmol L<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub>.





# 4. CONCLUSÕES

Verificaram-se diferenças na degradação da flumequina em solução aquosa pelos processos fotólise, POAE e POAFE. Os processos POAE e POAFE atingiram eficiências de degradação máximas similares de 83% e 85%, respectivamente, quando empregados 45 mA cm<sup>-2</sup> de densidade de corrente e 0,025 mol L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte, após 60 min de ensaio.

Em nenhuma das condições avaliadas nesse trabalho foi observada a total degradação da flumequina em solução aquosa. O processo POAFE foi mais eficaz do que o processo POAE na remoção da atividade antimicrobiana das soluções submetidas aos tratamentos. Foi observada a total remoção da atividade antimicrobiana quando aplicados 45 mA cm<sup>-2</sup> de densidade de corrente, aos 60 min de ensaio. A utilização de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte dificultou a identificação dos produtos de degradação, devido à formação de adutos. A perda do flúor da molécula da flumequina formou o produto com m/z 244, o qual apresentou menor atividade antimicrobiana.

# REFERÊNCIAS

- 1. Tamtam, F.; Mercier, F.; Le Bot, B.; Eurin, J.; Dinh, Q.T.; Clément, M.; Chevreuil, M.; *Sci. Total Environ.* **2008**, 393, 84.
- Dorival-García, N.; Zafra-Gómez, A.; Cantarero, S.; Navalón, A.; Vílchez, J. L.; *Microchem. J.* 2013, 106, 323.
- Yiruhan; Wang, Q-J.; Mo, C-H.; Li, Y-W.; Gao, P.; Tai, Y-P.; Zhang, Y.; Ruan, Z-L.; Xu, J-W.; *Environ. Pollut.* 2010, 158, 2350.
- 4. La Ferré, M.; Pérez, S.; Kantiani, L.; Barceló, D.; Trends Anal. Chem. v.27, n.11, 991-1007, 2008.
- 5. Reyes, C.; Fernández, J.; Freer, J.; Mondaca, M. A.; Zaror, C.; Malato, S.; Mansilla, H. D.; J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2006, 184, 141.
- Duong, H. A.; Pham, N. H.; Nguyen, H. T.; Hoang, T. T.; Pham, H. V.; Pham, V. C.; Berg, M.; Giger, W.; Alder, A. C.; *Chemosphere* 2008, 72, 968.
- 7. Palominos, R.; Freer, J.; Mondaca, M.A.; Mansilla, H.D.; Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **2008**, 193, 139-145.
- 8. Klamerth, N.; Rizzo, L.; Malato, S., Maldonado, M.I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.R.; Water Research 2010, 44, 545-554.
- 9. Da Silva, C.R.; Maniero, M.G.; Rath, S.; Guimarães, J.R.; Journal of Advanced Oxidation Technologies **2011**, 14, 106-114.
- 10. Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A. M.; Chem. Rev. 1993, 93, 671-698.
- 11. Fukunaga, M. T.; Tese de Doutorado, Universidade de Campinas, Brasil, 2003.
- 12 Guimarães, J. R.; Farah, C. R.; Maniero, M. G.; Fadini, P. S.; Journal of Environmental Management 2012, 107, 96-101.
- 13. Garcia-Segura, S.; Garrido, J. A.; Rodriguez, R. M.; Cabot, P. l.; Centellas, F.; Arias, C.;

Brillas, E.; Water Research 2012, 46, 2067-2076

- 14. Guinea, E.; Garrido, J.A.; Rodríguez, R.M.; Cabot, P.; Arias, C.; Centellas, F.; Brillas, E.; Electrochimica Acta 2010, 55, 2101–2115.
- 15. Bertazzoli, R.; Pelegrini, R.; Química Nova, **2002**, 25, 447-482.
- 16. Rodrigues-Silva, C.; Maniero, M. G.; Rath, S.; Guimarães, J. R.; Chem. Eng. J. 2013, 224, 46.
- 17. Rodrigues-Silva, C.; Maniero, M.G.; Rath, S.; Guimarães, J.R.; Science of the Total Environment, **2013**, 445–446, 337–346.
- 18. Jara, C. C.; Fino, D.; Specchia, V.; Saracco, G.; Spinelli P.; Applied Catalysis B: Environmental **2007**, 70, 479–487.
- 19. Dirany, A.; Sirés, I.; Oturan, N.; Mehmet A. Oturan, M. A.; Chemosphere, **2010**, 81, 594–602.
- 20. Sirtori, C.; Zapata, A.; Malato, S.; Gernjak, W.; Fernández-Alba, A.R.; Agüera, A; Photochemical & Photobiological Sciences 2009, 8, 644–651.
- 21. Sirtori, C.; Zapata, A.; Gernjak, W.; Malato, A.; Agüera, A.; Chemosphere **2012**, 88, 627–634.
- 22. Albini, A.; Monti, S.; Chem. Soc. Rev. 2003, 32, 238-250.
- 23. Klamerth, N.; Rizzo, L.; Malato, S., Maldonado, M.I.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A.R.; Water Research 2010, 44, 545-554.
- 24. Hoffmann, E.; Stroobant, V.; Mas Spectrometry Principles and Applications, 3th ed., Wiley: England, 2007.

# **5. CONCLUSÕES**

O método analítico utilizada foi eficaz para determinar a redução da concentração de flumequina nas soluções aquosas submetidas à degradação pelos POA.

Dentre os processos avaliados, os processos oxidativos avançados UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e UV/TiO<sub>2</sub> foram os mais efetivos na degradação da flumequina em solução aquosa; aproximadamente 100% do fármaco foi degradado por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando aplicado 1,0 mmol L<sup>-1</sup> do oxidante e por UV/TiO<sub>2</sub> quando utilizado 0,62 mmol L<sup>-1</sup> do catalisador. O reagente de Fenton degradou 40% da flumequina, após 15 min de reação, quando empregado 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Fe(II) e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já o processo foto-Fenton (C<sub>H2O2</sub> = 10,0 mmol L<sup>-1</sup>, C<sub>Fe(II)</sub> = 0,25 mmol L<sup>-1</sup>) foi capaz de degradar 94% do antimicrobiano após 60 min de ensaio. Os processos eletroquímico e fotoeletroquímico atingiram eficiências máximas de degradação similares: 82% e 85%, respectivamente. A fotólise foi eficiente apenas quando empregadas altas doses de radiação UV (5.677 mJ cm<sup>-2</sup>), atingindo a degradação máxima de 96,8% da flumequina após 60 min. O processo peroxidação foi ineficiente, atingindo a máxima degradação de 12,6% quando utilizado 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nos espectros de absorbância das soluções submetidas aos processos fotólise, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foto-Fenton e UV/TiO<sub>2</sub> observou-se a redução dos picos de absorbância ao longo do tempo de experimento. Para o reagente de Fenton, observou-se modificação no espectro de absorbância apenas nos primeiros 15 min, sendo que, para a peroxidação, não foi observada modificação nos espectros de absorbância das soluções submetidas a esse processo.

Significantes diferenças foram observadas nas atividades antimicrobianas residuais das soluções submetidas aos POA. A atividade antimicrobiana da solução decresceu conforme a flumequina foi degradada. A total desativação da atividade antimicrobiana foi observada nos processos fotólise (60 min), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $C_{H2O2} = 1,0$  mmol L<sup>-1</sup> e 30 min), UV/TiO<sub>2</sub> ( $C_{TiO2} = 0,62$  mmol L<sup>-1</sup> e 30 min de ensaio), foto-Fenton ( $C_{H2O2} = 10,0$  mmol L<sup>-1</sup>,  $C_{Fe(II)} = 0,25$  mmol L<sup>-1</sup> e 60 min de reação) e fotoeletroqímico (45 mA cm<sup>-2</sup>). A desativação

máxima observada no processo Fenton foi de 60% após 15 min de reação, quando aplicados 2,0 mmol  $L^{-1}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,5 mmol  $L^{-1}$  de Fe(II).

Os principais caminhos de degradação propostos nesse trabalho, com base nos espectros de massa das amostras submetidas aos POA, foram a descarboxilação, a perda de fluoreto e a hidroxilação da molécula de flumequina. Os intermediários formados propostos não apresentam atividade antimicrobiana superior à da flumequina, devido às modificações no sítio ativo das moléculas.

Para o tratamento de efluentes farmacêuticos que contenham baixas concentrações de antimicrobianos, a avaliação da toxicidade não fornece informações sobre a qualidade final do efluente tratado. É de fundamental importância a utilização de ensaios que avaliem a atividade biológica dos mesmos, ou seja, a atividade antimicrobiana.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AHI. Animal Health Industry. News release 14 Nov. 2008. Disponível em: http://www.ahi.org/files/Media/Center/Antibiotic/Use/202007.pdf. Acessado em: 02 fev. 2013.
- 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.
- Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. **Chemosphere** v. 57, 505–512, 2004.
- Almeida, E., Assalin, M. R., Rosa, M. A., Duran, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova** v. 27, n. 5, 818-824, 2004.
- An, T., Yang, H., Li, G., Song, W., Cooper, W. J., Nie, X. Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. Applied Catalysis B: Environmental v. 94, 288–294, 2010.
- Andreozzi, R.; Caprio, V.; Insola, A.; Marotta, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today** v. 53, 51-59, 1999.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere** v. 50, 1319–1330, 2003.
- Andreu, V., Blasco, C., Pico, Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. **Trends in Analytical Chemistry** v. 26, n. 6, 2007.
- Andriole, V. T. The Quinolones: Past, present, and future. Clinical infectious diseases (Supplement article) v. 41, S113-119, 2005.
- AZEVEDO, E. B. Identificação e toxicidade de intermediários formados na degradação fotocatalítica e na ozonização de fenol em meio salino. 2003. Tese de Doutorado, UFRJ-COPPE, 2003.
- Babic, S., Perisa, M., Skoric, I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. **Chemosphere** <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.072</u>, 2013.
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L. H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Aquatic Toxicology v. 49, 49–61, 2000.
- Balcioglu, I. A., Otker, M. Pre-treatment of antibiotic formulation wastewater by O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and O<sub>3</sub>/UV processes. **Turkish Jornal of Engeeniring Environmental Science** v. 28, 325-33,1 2003.

- BALL, P. Champter 1: The quinolones history and overview. The Quinolones, Third Edition. Scotland, United Kingdom: University of St. Andrews, Academic Press, 1-31, 2000.
- Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Bailac, S., Barbosa, J. *et al.* Simultaneous determination of flumequine and oxolinic acid in chicken tissues by solid phase extraction and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta** v. 477, 21-27, 2003.
- Batt, A. L., Kim, S., Aga, D. S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. **Chemosphere** v. 68, 428–435, 2007.
- Ben, W., Qiang, Z., Pan, X., Chen, M. Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor (SBR) pretreated swine wastewater by Fenton's reagent. Water Reserach v. 43, 4392-4402, 2009.
- Bernabeu, A., Vercher, R. F., Santos-Juanes, L., Simón, P. J., Lardín, C., Martínez, M. A., Vicente, J. A., González, R., Llosá, C., Arques, A., Amat, A. M. Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. Catalysis Today v. 161, 235–240, 2011.
- Bertazzoli, R., Pelegrini, R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em solução aquosa através do processo fotoeletroquímico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 477-482, 2002.
- Bolon, M. K. The newer fluoroquinolones. Infectious Disease Clinics of North America v. 23, 1027-1051, 2009.
- 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.
- 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.
- Carucci, A., Cappai, G., Piredda, M. Biodegradability and toxicity of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Enginnering v. 41, n. 9, 1831-1842, 2006.
- 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. Disponível em: <u>http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-cetesb/43-normas-tecnicas-cetesb</u>. Acessado em: 20 de mar. de 2012.
- 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.
- Chatzitakis, A., Berberidou, C., Paspaltsis, I., Kyriakou, G., Sklaviadis, T., Poulios, I. Photocatalytic degradation and drug activity reduction of chloramphenicol. **Water Research** v. 42, 386–394, 2008.

- Chen, M., Chu, W. Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous solution by visible-lightmediated C-TiO<sub>2</sub> photocatalysis. **Journal of Hazardous Materials** v. 219–220, 183–189, 2013.
- Chu, W., Choy, W. K., So, T. Y. The effect of solution pH and peroxide in the TiO<sub>2</sub>- induced photocatalysis of chlorinated aniline. Journal of Hazardous Materials v. 141, 86–93, 2007.
- Cisneros-Farrar, F., Parsons, I. C. Antimicrobials: classifications and uses in critical care. Cirtical Care Nursing Clinics of North America v. 19, 43-51, 2007.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografía. Editora UNICAMP. Campinas, SP, 2006.
- Da Silva, C. R., Maniero, M. G., Rath, S., Guimarães, J. R. Antibacterial activity inhibition after the degradation of flumequine by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Journal of Advanced Oxidation Technologies v. 14, 106-114, 2011.
- Dal Bosco, S. M., Barbosa, I. M., Candello, F. P., Maniero, M. G., Rath, S., Guimarães, J. R. Degradation of ivermectin by Fenton and photo-Fenton and toxicity test using *Daphnia similis*. Journal of Advanced Oxidation Technologies v. 14, n. 2, 292–301, 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 46, 1947 1957, 2012.
- De Vries, H., Van Henegouwen, G. M. J. B. Photochemical decomposition of lomefloxacin in vitro and in vivo. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology v. 58, 6–12, 2000.
- 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.
- 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, n. 7, 2498–2504, 2009.
- Dodd, M. C., Shah, A. D., Von Gunten, U., Huang, C-H. Interactions of fluoroquinolone antibacterial agents with aqueous chlorine: Reaction kinetics, mechanisms, and transformation pathways. Environmental Science & Technology v. 39, 7065-7076, 2005.
- Doll, T. E., Frimmel, F. H. Removal of selected persistent organic pollutants by heterogeneous photocatalysis in water. Catalysis Today v. 101, 195–202, 2005.
- 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.

- Duong, H. A., Pham, N. H., Nguyen, H. T., Hoang, T. T., Pham, H. V., Pham, V. C., Berg, M., Giger, W., Alder, A. C. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. Chemosphere v. 72, 968–973, 2008.
- Ellingsen, O. F., Midttun, B., Rogstad, A., Syvertsen, C., Samuelsen, O. B. Dosage regime experiments with oxolinic acid and flumequine in Atlantic salmon (Salmo salar L) held in seawater. Aquaculture v. 209, 19–34, 2002.
- Elmolla, E. S., Chaudhuri, M. Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> photocatalysis. **Desalination** v. 252, 46–52, 2010.
- EVANS, F. L. Ozone in water and wastewater treatment. Ann Arbor Science Publishers. Michigan, 1972.
- 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.
- Feitosa-Felizzola, J., Chiron, S. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). Journal of Hydrology v. 364, 50–57, 2009.
- Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxocology v. 76, 122-159, 2006.
- Fukunaga, M. T. "Estudo da degradação de efluentes aquosos derivados da indústria produtora de fenol através de eletrólise foto- assistida", Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas, SP, 2003.
- Gad-Allah, T. A., Ali, M. E. M., Badawy, M. I. Photocatalytic oxidation of ciprofloxacin under simulated sunlight. Journal of Hazardous Materials v. 186, 751–755, 2011.
- Galarini, R., Fioroni, L., Angelucci, F., Tovo, G. R., Cristofani, E. Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography A v. 1216, 8158–8164, 2009.
- 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-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.
- Giraldo, A. L., Penuela, G. A., Torres-Palma, R. A., Pino, N. J., Palominos, R. A., Mansilla, H. D. Degradation of the antibiotic oxolinic acid by photocatalysis with TiO<sub>2</sub> in suspension.
  Water Research 44, 5158-5167, 2010.

- Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W. Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. Analytical Chemistry v. 73, n. 15, 3632-3638, 2001.
- Graham, J. P., Boland, J. J., Silbergeld, E. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. **Public Health Reports** v. 122, 79-87, 2007.
- Guimarães, J. R., Barretto, A. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and *coliphages* in water. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 20, 403-411, 2003.
- Guimarães, J. R., Maniero, M. G., de Araújo, R. N. A comparative study on the degradation of RB-19 dye in an aqueous medium by advanced oxidation processes. Journal of Environmental Management v. 9, 110-133, 2012.
- Guinea, E., Garrido, J. A., Rodríguez, R. M., Cabot, P., Arias, C., Centellas, F., Brillas, E. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by electrochemical advanced oxidation processes based on hydrogen peroxide electrogeneration. Electrochimica Acta v. 55, 2101–2115, 2010.
- Gulkowska, A., Leung, H. W., So, M. K., Taniyasu, S., Yamashita, N., Yeung, L. W. Y., Richardson, B. J., Lei, A. P., Giesy, J. P., Lam, P. K. S., 2008. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. Water Research v. 42, 395-403, 2008.
- Guo, W., Shi, Y., Wang, H., Yang, H., Zhang G. Intensification of sonochemical degradation of antibiotics levofloxacin using carbon tetrachloride. Ultrasonics Sonochemistry 17, 680– 684, 2010.
- Hameed, B. H., Lee, T. W. Degradation of malachite green in aqueous solution by Fenton process. Journal of Hazardous Materials, v. 164, 468-472, 2009.
- Hapeshi, E., Achilleos, A., Vasquez, M. I., Michael, C., Xekoukoulotakis, 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.
- Haque, M. M., Muneer, M. Photodegradation of norfloxacin in aqueous suspensions of titanium dioxide. Journal of Hazardous Materials v. 145, 51–57, 2007.
- HARRISON, J. F. Ozone for Point-of Use, Point-of Entry, and Small Water System Water Treatment Aplications – A Reference Manual, The Water Quality Association, USA, 2000.
- Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta** v. 69, 334–342, 2006.
- Herrmann, M-J, Guillard, C. Photocatalytic degradation of pesticides in agricultural used waters. Chemistry, v. 3, 417-422, 2000.
- Herrmann, M-J, Guillard, C., Pichat, P. Heterogeneous photocatalysis : an emerging technology for water treatment. Catalysis Today, v. 17, 7-20, 1993.

- Hidalgo, M. E., Pessoa, C., Fernandez, E., Cárdenas, A. M. Comparative determination of photodegradation kinetics of quinolones. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry v. 73, 135-138, 1993.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT, V.; Mas Spectrometry Principles and Applications, 3th ed., Wiley: England, 2007.
- Homem, V., Santos, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices a review. Journal of Environmental Management v. 92, n. 10, 2304-2347, 2011.
- Hu, L., Flanders, P. M., Miller, P. L., Strathmann, T. J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. **Water Research** v. 41, 2612-2626, 2007.
- Hu, X., Zhou, Q., Luo, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. Environmental Pollution v. 158, 2992-2998, 2010.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária, março de 2011. Disponível em: www.ibge.gov.br Acessado em: 02 jan. 2013.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial, v. 29, n. 2, 1-186. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acessado em: 02 jan. 2013.
- Jara, C. C., Fino, D., Specchia, V., Saracco, G., Spinelli. Electrochemical removal of antibiotics from wastewaters. Applied Catalysis B: Environmental v. 70, 479–487, 2007.
- 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.
- Jjemba, P. K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety v. 63, 113-130, 2006.
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N. Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. **Critical Reviews in Toxicology** v. 34, n. 4, 335-350, 2004.
- Karci, A., Balcioglu, I. A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. Science of the Total Environment v. 407, 4652–4664, 2009.
- Karthikeyan, K. G., Meyer, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. Science of the Total Environment v. 361, 196–207, 2006.
- 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, 2009a.
- Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. **Chemosphere** v. 77, 518-525, 2009b.
- KING, D. E., MALONE, R., LILLEY, S. H. Classification and update on the quinolone antibiotics. American Family Physician v. 9, 2741-2748, 2000.

- Klamerth, N., Malato, S., Agüera, A., Fernández-Alba, A. Photo-Fenton and modified photo-Fenton at neutral pH for the treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluents: A comparison. **Water Research** v. 47, 833-840, 2013.
- Klamerth, N., Malato, S., Maldonado, M. I., Agüera, A., Fernández-Alba, A. Modified photo-Fenton for degradation of emerging contaminants in municipal wastewater effluents. **Catalysis Today** v. 161, 241–246, 2011.
- Klamerth, N., Rizzo, L., Malato, S., Maldonado, M. I., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R. Degradation of fifteen emerging contaminants at μgL-1 initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents. **Water Research** v. 44, 545-554, 2010.
- Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E. M., Zaugg, S. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environmental Science & Technology v. 36, n. 6, 1202-1211, 2002.
- Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment A review Part I. Chemosphere, v. 75, 417-434, 2009.
- Kusari, S., Prabhakaran, D., Lamshöft, M., Spiteller, M. In vitro residual anti-bacterial activity of difloxacin, sarafloxacin and their photoproducts after photolysis in water. **Environmental Pollution** v. 157, 2722–2730, 2009.
- Lai, H-T., Lin, J-J. Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments. **Chemosphere** 75, 462–468, 2009.
- 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.
- Li, Y., Niu, J., Wang, W., 2011. Photolysis of enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. **Chemosphere** v. 85, 892–897, 2011.
- Li, Y., Zhang, F., Liang, X., Yediler, A. Chemical and toxicological evaluation of an emerging pollutant (enrofloxacin) by catalytic wet air oxidation and ozonation in aqueous solution. Chemosphere v. 90, 284–291, 2013.
- Li, Y., Zhang, P., Wu, M., Liu, W., Yi, Z., Yang, M., et al. An effective oxidation of 2,3,6trimethylphenol to 2,3,5-trimethylbenzoquinone using Fenton's reagent under mild conditions. **Chemical Engineerig Journal** v. 146, 270–274, 2009.
- Lin, A. Y-C., Yu, T-H., Lateef, S. K., 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. Journal of Hazardous Materials v. 167, 1163–1169, 2009.
- Liu B., Liu X. L. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. Science of Total Environment v.74, 269-320, 2004.
- Liu, C., Nanaboina, V., Korshin, G. V., Jiang, W., 2012. Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater. Water Research v. 46, 5235-5246, 2012.

- Lopez, A., Bozzi, A., Mascolo, G., Kiwi, J. Kinetic investigation on UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradations of pharmaceutical intermediates in aqueous solution. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry v. 156, 121-126, 2003.
- Ma, F., Yuan, G., Meng, L., Oda, Y., Hu, J. Contributions of flumequine and nitroarenes to the genotoxicity of river and ground waters. **Chemosphere** v. 88, 476–483, 2012.
- Malato, S., Fernández-Ibánez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., Gernjak, W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. **Catalysis Today** v. 147, 1–59, 2009.
- Maniero, G. M., Bila, D. M., Dezotti, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17βestradiol and 17α-ethinylestradiol by ozonation and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Science of the Total Environment v. 407, 105-115, 2008.
- Mansilla, H. D., Mora, A., Pincheira, C., Mondaca, M. A., Marcato, P. D., Durán, N., Freer, J. New photocatalytic reactor with TiO<sub>2</sub> coating on sintered glass cylinders. **Applied** Catalysis B: Environmental v. 76, 57–63, 2007.
- 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.
- Maudhuit, A., Raillard, C., Héquet, V., Le Coq, L., Sablayrolles, J., Molins, L. Adsorption phenomena in photocatalytic reactions: the case of toluene, acetone and heptane. **Chemical Engineering Journal** v. 170, 464–470, 2011.
- Mazille, F., Lopez, A., Pulgarin, C. Synergistic effect of TiO<sub>2</sub> and iron oxide supported on fluorocarbon films Part 2: long-term stability and influence of reaction parameters on photoactivated degradation of pollutants. Applied Catalysis B: Environmental v. 90, 321–329, 2009.
- 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, n. 1, 188-197, 2009.
- Méndez-Arriaga, F., Esplugas, S., Giménez, J. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. **Water Research** v. 44, 589-595, 2010.
- Michael, I., Hapeshi, E., Michael, C., Fatta-Kassinos, D. Solar Fenton and solar TiO<sub>2</sub> catalytic treatment of ofloxacin in secondary treated effluents: evaluation of operational and kinetic parameters. **Water Research** v. 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.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. **Water Research** v. 47, 957-995, 2013.
- Miralles-Cuevas, S., Arqués, A., Maldonado, M. I., Sánchez-Pérez, J. A., Rodríguez, S. M. Combined nanofiltration and photo-Fenton treatment of water containing micropollutants. **Chemical Engineering Journal** http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.068, 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 TiO<sub>2</sub> 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.
- Nagulapally, S. R., Ahmad, A., Henry, A., Marchin, G. L., Zurek, L., Bhandari, A. Occurrence of ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. Water Environment Research v. 81, 82-90, 2009.
- Najjar, N. H., Deborde, M., Journel, R., Vel Leitner, N. K. Aqueous chlorination of levofloxacin: Kinetic and mechanistic study, transformation product identification and toxicity. Water Research v. 47, 121-129, 2013.
- 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.
- Neugebauer, U., Szeghalmi, A., Schmitt, M., Kiefer, W., Popp, J., Holzgrabe, U. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. **Spectrochimica Acta Part A:** Molecular and Biomolecular Spectroscopy v. 61, 1505–1517, 2005.
- Neyens, E., Baeyens, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. Journal of Hazardous Materials v. B98, 33-50, 2003.
- Nieto, J., Freer, J., Contreras, D., Candal, R. J., Sileo, E. E., Mansilla, H. D. Photocatalyzed degradation of flumequine by doped TiO<sub>2</sub> and simulated solar light. Journal of Hazardous Materials v. 155, 45–50, 2008.
- Nogueira, R. F. P., Jardim, W. F. A fotocatálise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, 69-72, 1998.
- Nogueira, R. F. P., Trovó, A. G., Silva, M. R., Villa, R. D. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-Fenton. **Quimíca Nova** v. 30, 400-408, 2007.
- Nogueira, R. F. P.; Oliveira, M. C.; Paterlini, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of  $H_2O_2$  in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta** v. 66, 86-91, 2005.
- Owens, R. C., Ambrose, P. G. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. Clinical Infectious Diseases v. 41, S144-157, 2005.
- Paleologou, A., Marakas, H., Xekoukoulotakis, N. P., *et al.* Disinfection of water and wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis sonolysis and UV-C irradiation. **Catalysis Today** v. 129, 136-142, 2007.
- 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.

- Paschoalino, M. P. "Utilização da fotocatálise heterogênea na desinfecção de atmosferas confinadas". Dissertação de mestrado, UNICAMP, Instituto de Química, Campinas, SP, 2006.
- 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.
- Paul, T., Miller, P. L., Strathmann, T. J., Visible-light-mediated TiO<sub>2</sub> photocatalysis of fluoroquinolone antibacterial agents. Environmental Science & Technology v. 41, 4720-4727, 2007.
- Perini, J. A. L., Perez-Moya, M., Nogueira, R. F. P. Photo-Fenton degradation kinetics of low ciprofloxacin concentration using different iron sources and pH. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry <a href="http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jphotochem.2013.03.002">http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jphotochem.2013.03.002</a>, 2013.
- Pollice, A., Laera, G., Cassano, D., Diomede, S., Pinto, A., Lopez, A., Mascolo, G. Removal of nalidixic acid and its degradation products by an integrated MBR-ozonation system. Journal of Hazardous Materials v. 203–204, 46–52, 2012.
- Pouliquen, H., Delépée, R., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M., Le Bris, H. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. Aquaculture v. 262, 23-28, 2007.
- Pozo, O. J., Guerrero, C., Sancho, J. V., Ibánez, 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.
- Prabhakaran, D., Sukul, P., Lamshöft, M., Maheswari, M. A., Zühlke, S., Spiteller, M. Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems. **Chemosphere** v. 77, 739–746, 2009.
- Pretali, L., Fasani, E., Dondi, D., Mella, M., Albini, A. The unexpected photochemistry of marbofloxacin. Tetrahedron Letters v. 51, 4696–4708, 2010.
- Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G. L., Malato, S. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO<sub>2</sub> concentrations. Journal of Hazardous Materials v. 211–212, 131–137, 2012.
- Regitano, J. B., Leal, R. M. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 34, 601-616, 2010.
- Reis Filho, R. W., Barreiro, J. C., Vieira, E. M., Cass, Q. B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambiente & Água** v. 2, 54-61, 2007.
- Reyes, C., Fernández, J., Freer, J., Mondaca, M. A., Zaror, C., Malato, S., Mansilla, H. D. Degradation and inactivation of tetracycline by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry v. 184, 141–146, 2006.
- Rivas, F. J., Beltrán, F. J., Encinas, A. Removal of emergent contaminants: integration of ozone and photocatalysis. Journal of Environmental Management v. 100, 10-15, 2012.

- Rivas, J., Gimeno, O., Borralho, T., Carbajo, M. UV-C photolysis of endocrine disruptors: the influence of inorganic peroxides. Journal of Hazardous Materials v. 174, 393–397, 2010.
- Rodrigues-Silva, C., Maniero, M. G., Rath, S., Guimarães, J. R. Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity. **Chemical Engineering Journal** http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.002, 2012.
- Rodrigues-Silva, C., Maniero, M. G., Rath, S., Guimarães, J. R. Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity. **Science of the Total Environment** v. 445-446, 337-346, 2013.
- 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.
- Rozas, O., Contreras, D., Mondaca, M. A., Pérez-Moya, M., Mansilla, H. D. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. Journal of Hazardous Materials v. 177, 1025–1030, 2010.
- Ruiz-García, A., Bermejo, M., Merino, V., Sánchez-Castaño, G., Freixas, J., Garrigues, T. M. Pharmacokinetics, bioavailability and absorption of flumequine in the rat. **European** Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics v. 48, 253–258, 1999.
- Scholar, E. M. Fluoroquinolines: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. American Journal of Pharmaceutical Education v. 66, 164-172, 2003.
- Scott, L. C., Menzies, P. I. Antimicrobial resistance and small ruminant veterinary practice. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice v. 27, 23–32, 2011.
- Shemer, H., Kunukcu, Y. K., Linden, K. G. J. Degradation and by-product formation of diazinon in water during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. **Journal of Hazardous Materials** v. B136, 553-559, 2006.
- Shen, L. L., Mitscher, L. A., Sharma, P. N., O'Donnell, T. J., Chu, D. W. T., Cooper, C. S., Rosen, T., Pernett, A. G. Mechanism of inhibition of DNA-gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. Biochemistry v. 28, 3886–3894, 1989.
- Sirtori, C., Zapata, A., Gernjak, W., Malato, A., Agüera, A. Photolysis of flumequine: identification of the major phototransformation products and toxicity measures. **Chemosphere** 88, 627–634, 2012.
- Sirtori, C., Zapata, A., Gernjak, W., Malato, S., Lopez, A., Agüera, A. Solar photo-Fenton degradation of nalidixic acid in waters and wastewaters of different composition. Analytical assessment by LC-TOF-MS. **Water Research** v. 45, 1736-1744, 2011.
- Sirtori, C., Zapata, A., Malato, S., Gernjak, W., Fernández-Alba, A. R., Agüera, A. Solar photocatalytic treatment of quinolones: intermediates and toxicity evaluation. Photochemical & Photobiological Sciences v. 8, 644–651, 2009
- Son, H-S., Ko, G., Zoh, K-D. Kinetics and mechanism of photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis of triclosan. Journal of Hazardous Materials v. 166, 954–960, 2009.

- Sousa, M. A., Gonçalves, C., Vilar, V. J. P., Boaventura, R. A. R., Alpendurada, M. F. Suspended TiO<sub>2</sub>-assisted photocatalytic degradation of emerging contaminants in a municipal WWTP effluent using a solar pilot plant with CPCs. Chemical Engineering Journal v. 198–199, 301–309, 2012.
- Soutsas, K., Karayannis, V., Poulios, I., Riga, A., Ntampegliotis, K., Spiliotis, X., Papapolymerou, G. Decolorization and degradation of reactive azo dyes via heterogeneous photocatalytic processes. **Desalination** v. 250, 345–350, 2010.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Fasani, E., Albini, A., Migliavacca, R., Nucleo, E. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. Water Research 46, 5575-5582, 2012a.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Irastorza, E. A., Fasani, E., Albini, A. Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. Applied Catalysis B: Environmental v. 119–120, 32– 39, 2012b.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., Profumo, A., Pretali, L., Fasani, E., Albini, A. Sunlight-induced degradation of soil-adsorbed veterinary antimicrobials marbofloxacin and enrofloxacin. Chemosphere v. 86, 130-137, 2012c.
- Szczepanowski, R., Linke, B., Krahn, I., Gartemann, K-H., Tim Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic- resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiology v. 155, 2306–2319, 2009.
- 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.
- Tamtam, F., Van Oort, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Chevreuil, M., Lamy, I., Thiry, M. Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. Science of the Total Environment v. 409, 540–547, 2011.
- 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.
- Van der Graaf, P. H., Schoemaker, R. C. Analysis of asymmetry of agonist concentration–effect curves. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods v. 41, 107-115, 1999.
- Van der Weeën, P., Baetens, J. M., Verwaeren, J., Van Doorslaer, X., Heynderickx, P. M., Dewulf, J., De Baets, B., 2012. Modeling the photocatalytic degradation of moxifloxacin by means of a stochastic cellular automaton. Chemical Engineering Journal 188, 181– 190, 2012.
- Van Doorslaer, X., Demeestere, K., Heynderickx, P. M., Van Langenhove, H., Dewulf J., UV-A and UV-C induced photolytic and photocatalytic degradation of aqueous ciprofloxacin and moxifloxacin: reaction kinetics and role of adsorption. Applied Catalysis B: Environmental v. 101, 540–547, 2011.

- Van Doorslaer, X., Heynderickx, P.M., Demeestere, K., Debevere, K., Van Langenhove, H., Dewulf, J. TiO<sub>2</sub> mediated heterogeneous photocatalytic degradation of moxifloxacin: operational variables and scavenger study. Applied Catalysis B: Environmental v. 111– 112, 150–156, 2012.
- Vasconcelos, T. G., Henriques, D. M., König, A., Martins, A. F., Kümmerer, K. Photodegradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: identification and biodegradability assessment of the primary by-products. **Chemosphere** v. 76, 487–493, 2009.
- Vasconcelos, T. G., Kummerer, K., Henriques, D. M., Martins, A. F. Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. Journal of Hazardous Materials v. 169, 1154–1158, 2009.
- 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.
- Vieno, N. M., Kärkki, H., Tuhkanen, T., Kronberg. Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant. Environmental Science & Technology v. 41, 5077-5084, 2007.
- Villa, R., Cagnardi, P., Acocella, F., Massi, P., Anfossi, P., Asta, F., Carli, S. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of flumequine in pigs after single intravenous and intramuscular administration. **The Veterinary Journal** v. 170, 101–107, 2005.
- Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A., d'Ischia, M. Kinetic and chemical assessment of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of antiepileptic drug carbamazepine. **Chemosphere** v. 54, 497-505, 2004.
- Von Gunten, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. Water Research v. 37, 1443-1467, 2003.
- Wammer, K. H., Korte, A. R., Lundeen, R.A., Sundberg, J. E., McNeill, K., Arnold, W. A. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. Water Research v. 47, 439-448, 2013.
- 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 44, 5989-5998, 2010.
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., Costanzo, S. D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. Science of the Total Environment v. 407, 2711–2723, 2009.
- WHO, 1998. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO Meeting – Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Geneva, Switzerland, June/1998.
- Wu, C., Linden, K. G. Degradation and byproduct formation of parathion in aqueous solutions by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. **Water Research** v. 42, 4780- 4790, 2008.

- 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
- Xie, Y., Li, X-W,. Wang, J-F., Christakos, G., Hu, M-G., An, L-H., Li, F-S. Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China. Science of the Total Environment v. 430, 126–131, 2012.
- Xu, W, Zhang, G., Li, X., Zou, S., Li, P., Hu, Z., Jun, L. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. Water Research v. 41, 4526-4534, 2007.
- Yang, H., Li, G., An, T., Gao, Y., Fu, J. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub> a case of sulfa drugs. Catalysis Today v. 153, 200–207, 2010.
- Ye, Z., Weinberg, H. S. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry** v. 79, 1135-1144, 2007.
- Yiruhan, Wang, Q-J., Mo, C-H., Li, Y-W., Gao, P., Tai, Y-P., Zhang, Y., Ruan, Z-L., Xu, J-W. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. Environmental Pollution v. 158, 2350-2358, 2010.
- Zhang, J., Fu, D., Wu, J. Photodegradation of norfloxacin in aqueous solution containing algae. **Journal of Environmental Sciences** v. 24, n. 4, 743–749, 2012.

# APÊNDICES

# APÊNDICE 1 – Metodologia analítica

# A1.1 – Cromatografia

Na literatura existem diversos métodos para detecção e quantificação de flumequina em amostras aquosas, baseados na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores UV, arranjos de fotodiodos ou fluorescência (Belal *et al.*,1999; Prat *et al.*, 2004; Paschoal, 2007). No estudo em questão, a concentração da flumequina nas soluções submetidas aos processos oxidativos avançados foi avaliada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector UV (HPLC-UV).

O cromatógrafo a líquido de alta eficiência utilizado no desenvolvimento deste trabalho é composto por um sistema de bombeamento unitário modelo Waters 510 (Waters, EUA), injetor modelo 7725 (Rheodyne, EUA), amostrador de 20  $\mu$ L e detector UV modelo 486 (Waters, EUA). A quantificação foi feita em 236 nm. Para a aquisição dos dados foi utilizado um integrador modelo 746 (Waters, EUA). A coluna analítica utilizada para a separação foi a XBrige<sup>-TM</sup> RP18 da Waters (250 mm x 4,6 mm DI, 5  $\mu$ m). A fase móvel foi constituída por metanol e 0,01 mol L<sup>-1</sup> ácido oxálico (60:40, v/v). A vazão foi de 1 mL min<sup>-1</sup>.

A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada a partir dos cromatogramas adquiridos, conforme Collins *et al.* (2006). Os parâmetros avaliados para a flumequina foram: número de pratos (N  $_{>2.000}$  = 4.800), fator de assimetria (As10  $_{0,9-1,2}$  = 0,97) e fator de retenção (k  $_{>1,5}$  = 1,71).

A validação do método analítico para a quantificação de flumequina foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: seletividade, faixa linear (intervalo) de trabalho, linearidade, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão.

A faixa linear estabelecida pela curva analítica de trabalho, que representa a relação entre a resposta do instrumento (área) e a concentração conhecida do analito, foi obtida na faixa de concentração de 0,25 a 25 mg L<sup>-1</sup>. A equação da reta, obtida pela análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários, foi y = 224155 \* C - 80466, onde y representa a área do pico cromatográfico e C a concentração da flumequina. Na Figura A1.1 é apresentada a curva analítica utilizada neste trabalho e na Tabela A1.1 os dados de LOD, LOQ, linearidade (r), precisão e exatidão do método utilizado.



Figura A1.1: Curva analítica da flumequina

A linearidade, expressa como o coeficiente de regressão linear da reta, foi avaliada a partir da curva analítica, sendo determinada igual a 0,998. O LOD do instrumento foi determinado pela relação sinal-ruído (da linha de base) no tempo de retenção da flumequina, estabelecido pela proporção 3:1, e para o LOQ do instrumento pela proporção 10:1. O LOD e LOQ do instrumento foram respectivamente de 0,06 mg L<sup>-1</sup> e 0,25 mg L<sup>-1</sup>. Neste trabalho foi empregada a extração em fase sólida (SPE), sendo as amostras submetidas ao processo de degradação concentradas 250 vezes antes de serem analisadas por HPLC. Levando em

consideração que as amostras foram concentradas 250 vezes, o LOD e LOQ do método são de  $0,24 \ \mu g \ L^{-1} \ e \ 1,0 \ \mu g \ L^{-1}$ , respectivamente.

A precisão (estimativa do desvio padrão) inter-corrida, determinada pela repetitividade de análise de uma mesma amostra em dias diferentes e no mesmo equipamento, foi avaliada em 3 níveis de concentração, contemplando o intervalo linear do método, com 3 réplicas (n=3) cada. A precisão inter-corrida do método foi de 4,27%, 4,32% e 9,03% para as amostras contendo 5,0 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup> e 25 mg L<sup>-1</sup> de flumequina, respectivamente. 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 0,87% para 20 mg L<sup>-1</sup> do analito (n=3).

Equação da reta	y = 224155*C - 80466	
Linearidade (r <sup>2</sup> )	0,998	
LOD do instrun	$0,06 \text{ mg L}^{-1}$	
LOD do método	$0,24 \ \mu g \ L^{-1}$	
LOQ do instrun	$0,25 \text{ mg L}^{-1}$	
LOQ do método	1,0 $\mu$ g L <sup>-1</sup>	
Exatidão	$20 \text{ mg L}^{-1} (n = 3)$	96,9 - 106,6%
Precisão		
Inter-corrida:	$25 \text{ mg L}^{-1} (n=3)$	4,27%
	$20 \text{ mg } \text{L}^{-1} (n = 3)$	4,32%
	$5 \text{ mg } L^{-1} (n = 3)$	9,03%
Intra-corrida:	$20 \text{ mg } \text{L}^{-1} (n=3)$	0,87%

Tabela A1.1: Parâmetros da metodologia analítica utilizada

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação de uma amostra contendo 20 mg  $L^{-1}$  do analito (n=3). A exatidão ficou entre 96,9 e 106,6%, quando avaliadas amostras contendo 20,0 mg  $L^{-1}$  de flumequina, valor aceitável para o nível de concentração avaliado.

# A1.2 - Extração em fase sólida (SPE)

Considerando a concentração inicial de trabalho (500 µg L<sup>-1</sup>), o LOD e o LOQ do método cromatográfico estabelecido para monitorar a concentração de flumequina nos ensaios de degradação, se fez necessário realizar uma etapa prévia de concentração do analito. Para tanto, foi empregada a extração em fase sólida. A SPE é uma técnica amplamente empregada no preparo de amostras com finalidade de concentração e eliminação de interferentes e tem sido empregada com sucesso na concentração de inúmeros fármacos veterinários (Turien *et al.*, 2003; Barrón *et al.*, 2003; Prat *et al.*, 2006; Tamtam *et al.*, 2008; Maniero *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2011; Dal Bosco *et al.*, 2012; Rodrigues-Silva *et al.*, 2012; Rodrigues-Silva *et al.*, 2013). Dois cartuchos para extração em fase sólida foram avaliados: uma a base de sílica octadecil - C<sub>18</sub> (500 mg / 6 mL), da Varian, e um polimérico de balanço hidrofílico-lipofílico Oasis<sup>TM</sup> (500 mg / 6 mL), da Waters. Devido aos valores de recuperação da flumequina positivamente aceitáveis para ambos os cartuchos, optou-se pelo cartucho C<sub>18</sub> (500 mg / 6 mL), de menor custo, da Varian. Na Tabela A1.2 é apresentado o estudo da avaliação da eficiência de extração (recuperação) da flumequina nos dois cartuchos de extração avaliados.

Cflumequina	рН 7	рН 7
(µg L <sup>-1</sup> )	C <sub>18</sub> (Varian)	Oasis (Waters)
500	108,5	107,0
250	104,5	
125	108,0	110,6
100	95,6	
50	90,0	

Tabela A1.2: Avaliação da recuperação do analito pelos cartuchos de extração

O pH pode influenciar a eficiência de extração na técnica de SPE, principalmente quando a molécula é ionizável. Sendo assim, a eficiência de extração da flumequina no cartucho  $C_{18}$  da Varian foi avaliada em pH 3, 7 e 10, conforme apresentado na Tabela A1.3. O pH foi ajustado com 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH ou 0,1 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Optou-se neste trabalho proceder a extração das amostras no pH inicial das soluções submetidas aos processos oxidativos avançados, de aproximadamente pH 7. Em pH 10 a eficiência de extração não foi adequada, atingindo o máximo de 7,4%, ou seja o analito não ficou retido no cartucho neste pH.

Cflumequina	рН 3	рН 7	рН 10
500 μg L <sup>-1</sup>	104,6	108,5	3,0
250 μg L <sup>-1</sup>	110,0	104,5	4,0
125 μg L <sup>-1</sup>	99,0	108,0	7,4

Tabela A1.3: Avaliação do pH de extração.
## APÊNDICE 2 – Espectros de massa

Nesse anexo serão apresentados espectros de massa para ilustrar a formação dos intermediários de degradação para os processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton e foto-Fenton. A avaliação dos íons da flumequina e dos intermediários de degradação formados foram elucidadas com um ESI-QToF-MS. A estrutura e composição química dos intermediários propostos foram calculados com o software ChemDoodle v.4.1.1.

As estruturas dos produtos formados durante a degradação da flumequina pelos processos oxidativos avançados foram propostas baseando-se nos espectros de massas, incluindo análise MS/MS, composição elementar da flumequina, distribuição isotópica e mecanismos de reações orgânicas apresentados na literatura especializada.

Apesar de alguns intermediários formados durante o processo de degradação da flumequina terem sido previamente reportados (Palominos *et al.*, 2008; Sirtori *et al.*, 2009; Sirtori *et al.* 2012), em nenhum destes estudos relacionou-se os intermediários com a atividade antimicrobiana residual da solução submetida ao POA.

De acordo com Shen *et al.* (1989), a atividade antimicrobiana da flumequina está relacionada com as ligações de hidrogênio, que podem ser formadas, pincipalmente, entre o grupo carboxílico da quinolona e o DNA girase. As ligações de hidrogênio se formam entre os grupos aceptores das quinolonas: C=O, COOH e F (Shen *et al.*, 1989) (Figura A2.1).

A perda de qualquer sítio ligante da molécula da quinolona (Figura A2.1), no qual há a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio, diminui a sua atividade antimicrobiana em 840 vezes (Shen *et al.*, 1989).

Segundo Albini e Monti (2003), não é esperado o foto-rearranjo das fluoroquinolonas, uma vez que são moléculas heteroaromáticas polinucleares. Dessa forma, a sequência de reações com radicais hidroxila ou após a foto-excitação se dá por meio de reações de substituição ou de eliminação (Albini e Monti, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2009; Sturini *et al.*, 2012a).



Figura A2.1: Molécula de flumequina e os grupos aceptores de ligação de hidrogênio.

## A2.1 - Processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para as amostras submetidas ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram identificados cinco intermediários de reação, com sinal intenso nos espectros de massa: m/z 244, 238, 234, 218 e 202. Esses produtos foram formados e identificados entre 10 e 30 min de ensaio. Nas Figuras A2.2 e A2.3 são apresentados os espectros de massa das soluções de flumequina submetidas ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 min, quando utilizadas concentrações iniciais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1 mmol L<sup>-1</sup> (Figura A2.2) e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> (Figura A2.3). Aplicando uma dose de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se a formação de dois intermediários diferentes em relação às análises realizadas empregando-se 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

De acordo com Albini e Monti (2003), sob condições neutras, a principal modificação na estrutura das fluoroquinolonas pela foto-excitação é a perda de flúor, a qual é, então, seguida pela perda do grupo carboxílico (-COOH), por reações de foto-Kolbe. Durante o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, realizado em pH próximo ao neutro, observou-se o intermediário 5-metil-1-oxo-6,7-dihidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]quinolina-2-ácido carboxílico, com *m/z* 244, formado a partir da perda do flúor da molécula de flumequina (Figuras A2.2 e A2.3).

Após a perda do flúor, a descarboxilação da molécula m/z 244 foi proposta, originando o composto com m/z 202 (Figura A2.2). De acordo com Shen *et al.* (1989), o grupamento carboxílico presente nas moléculas das quinolonas garante sua atividade antimicrobiana. Portanto, uma vez rompida a ligação do radical carboxílico, espera-se que a molécula resultante não apresente atividade antimicrobiana.



**Figura A2.2.** Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo  $UV/H_2O_2$  ( $C_{H2O2} = 1,0 \text{ mmol } L^{-1}$ ) e estrutura molecular dos intermediários propostos.

O caminho de degradação por hidroxilação da molécula de flumequina também foi considerado, uma vez que os POA são baseados em reações com radicais hidroxila (Sirtori *et al.*, 2009). De acordo com Giraldo *et al.* (2010), o processo de hidroxilação dos compostos submetidos aos POA ocorre devido às reações de foto-Kolbe, as quais são bem conhecidas. Dessa forma, foi possível propor a formação do composto com m/z 218, resultado da descarboxilação da molécula de flumequina (Figura A2.3). A formação do composto com m/z 234 (Figura A2.3) provavelmente ocorreu após sucessivos ataques do radical hidroxila à molécula de flumequina.

Portanto, as reações de foto-Kolbe promoveram a substituição do flúor e do radical carboxílico da flumequina por uma hidroxila (originando a molécula m/z 234) ou um próton.



**Figura A2.3:** Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo  $UV/H_2O_2$  ( $C_{H2O2} = 0,5 \text{ mmol } L^{-1}$ ) e estrutura molecular dos intermediários propostos.

A perda do flúor na molécula de flumequina, seguida da perda do radical carboxílico, são as principais modificações na estrutura da quinolona após a exposição à radiação ultravioleta (Albini e Monti, 2003), resultando na abertura dos anéis aromáticos e na mineralização do composto. Porém, segundo Pretali *et al.* (2010), em meio ácido, o sítio alcalino da molécula deve ser o primeiro a sofrer modificações. A formação do produto com m/z 238 provavelmente ocorreu quando as reações de degradação da molécula iniciaram no sítio alcalino da flumequina, apresentado na Figura A2.2, ocorrendo a ruptura da ligação 1N-C do anel não aromático.

## A2.2 – Fenton e foto-Fenton

Durante a degradação da flumequina por Fenton e foto-Fenton, foram formados e propostos quatro intermediários de reação: m/z 244, m/z 238, m/z 220 e m/z 202, apresentados nas Figuras A2.4 a A2.6.



**Figura A2.4:** Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo Fenton  $(C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ e } C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}).$ 

Compostos heterocíclicos fluorados podem permanecer intactos quando as reações ocorrem em condições ácidas, levando, primeiramente, à reações na região alcalina da molécula (Pretali et al., 2010). Dessa forma, durante a degradação da flumequina por Fenton e foto-Fenton, realizada condições ácidas, foi а formação do composto em proposta 8-etil-6-fluoro-4-oxo-1,2,3,4-tetrahidroquinolina-3-ácido carboxílico (*m/z* de 238) (Figura A2.5), originado da clivagem da ligação C-1N do anel não aromático (reação no sítio de alcalino da molécula de flumequina).



**Figura A2.5:** Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo Fenton  $(C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ e } C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1})$  e estrutura molecular dos intermediários propostos.



**Figura A2.6:** Espectro de massa de uma solução de flumequina submetida ao processo foto-Fenton ( $C_{Fe(II)} = 5 \text{ mmol } L^{-1} \text{ e } C_{H2O2} = 10 \text{ mmol } L^{-1}$ ).

Conforme apresentado anteriormente, de acordo com Albini e Monti (2003), sob condições neutras, a principal modificação na estrutura das fluoroquinolonas pela foto-excitação é a perda de flúor. Visto que os POA envolvem reações com o radicais hidroxila, os quais possuem elevado potencial de redução e atacam as moléculas orgânicas de modo não seletivo, a perda do flúor poderia ser considerada um caminho possível na degradação da flumequina, mesmo sob condições ácidas (processo Fenton e foto-Fenton; pH = 2,8). Sirtori *et al.* (2009) monitoraram a degradação da flumequina pelos processos Fenton, foto-Fenton e fotocatálise e constataram um aumento considerável na concentração de flúor (na forma de  $F^-$ ), após submeter as amostras aos processos Fenton e foto-Fenton, em pH ácido. Esse trabalho dá suporte à formação do composto 5-metil-1-oxo-6,7-dihidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]quinolina-2-ácido carboxílico, o qual apresenta *m/z* de 244 e está apresentado na Figura A2.5.

A perda do flúor pode resultar na redução da atividade antimicrobiana do composto resultante em 840 vezes, visto a redução da possibilidade de formação de ligação de hidrogênio (Shen *et al.*, 1989). Dessa forma, pode-se propor ainda que a atividade antimicrobiana do composto m/z 244 deva ser menor do que a da flumequina.

Após a perda de flúor, a perda de COOH resultaria na formação do composto 9-fluoro-5-metil-1-oxo-6,7-dihidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]quinolina-2-ácido carboxílico (m/z de 202). De acordo com Shen *et al.* (1989), as quinolonas requerem o grupo 3-carboxila para ação. Dessa forma, os compostos propostos com m/z 202 não apresentam atividade antimicrobiana.

Finalmente, é importante destacar que o sinal da flumequina ainda estava presente nos espectros de massa das amostras submetidas aos processos UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fenton e foto-Fenton mesmo após 60 minutos de ensaio, confirmando que esse fármaco não foi completamente mineralizado por esses processos oxidativos avançados.