

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

JADSON GONÇALVES BATISTA

**AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA POR PENICILINA G
ACILASE**

JOÃO PESSOA - PB

2023

JADSON GONÇALVES BATISTA

AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA POR PENICILINA G ACILASE

Trabalho Final de Curso apresentado à
Coordenação de Engenharia Química do
Centro de Tecnologia da Universidade
Federal da Paraíba, em cumprimento aos
requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Lopes de
Oliveira Ferreira.

JOÃO PESSOA - PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B333a Batista, Jadson Gonçalves.
Avaliação da Hidrólise da Amoxicilina por Penicilina
G Acilase / Jadson Gonçalves Batista. - João Pessoa,
2023.
48 f. : il.

Orientação: Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Beta-lactâmicos; Michaelis-Menten; 6-APA. I.
Andrea Lopes de Oliveira Ferreira. II. Título.

UFPB/CT CDU 66.01(043.2)

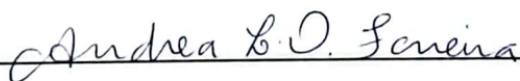
JADSON GONÇALVES BATISTA

AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA POR PENICILINA G ACILASE

Trabalho Final de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Engenharia Química
da Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 07 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA



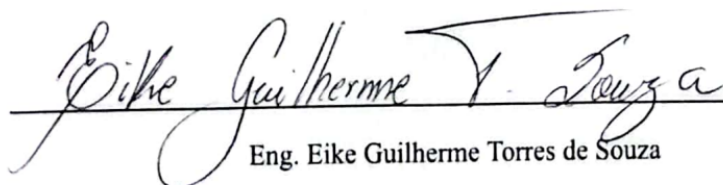
Prof.ª. Dr.ª. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira

Orientadora



Profa. Dra. Karla Silvana Menezes Gadelha de Sousa

Examinadora



Eng. Eike Guilherme Torres de Souza

Examinador

À minha mãe Jaqueline que com a sua
inteireza e fortaleza, soube lutar para
levar-me a alcançar as minhas metas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Jaqueline por todo o apoio e confiança, por sempre acreditar em mim, até quando duvidei, e por todas as dificuldades vencidas para que esse dia fosse possível; à professora Andrea Ferreira, por todo ensinamento, suporte, empatia e por sempre depositar confiança em nosso trabalho, nos ajudando da melhor maneira; a todos aqueles que tornaram a longa caminhada da graduação mais leve, meus amigos: Daniel Bezerra, Lais Cabral, Eike Guilherme, Jerffeson Lima, Nathália Vasconcelos, Leonardo, Isaac Feitosa, Rodrigo Mota e todos os outros que fizeram parte desta trajetória; às técnicas do Laboratório de Bioengenharia, Débora e Fabiana, pelos ensinamentos e por todas as contribuições em meus trabalhos; e a todos os professores do departamento de Engenharia Química da UFPB, pelos conhecimentos transmitidos.

A vida é uma grande universidade, mas
pouco ensina a quem não sabe ser aluno.

Augusto Cury.

RESUMO

A água é um recurso natural, finito, vulnerável e indispensável à vida. Entretanto, a presença de substâncias químicas no ambiente aquático tem sido cada vez mais frequente, inclusive em águas para o abastecimento público e industrial, sugerindo risco iminente à saúde humana e ambiental. Dentre as substâncias químicas mais incidentes no ambiente aquático estão os fármacos, dentre eles os antibióticos beta-lactâmicos, a classe de antibióticos mais prescrita e com mais indicações clínicas, tal qual a amoxicilina. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variáveis que influenciam a hidrólise da amoxicilina via rota enzimática e a sua cinética. Para isso, foi utilizado um planejamento composto central, em que foram analisadas as variáveis: concentração inicial de amoxicilina, temperatura e pH na hidrólise do antibiótico. A faixa de valores das variáveis estudadas foi de 0,16 a 1,84 (% p/v) para a concentração inicial de amoxicilina; 26 a 49 °C; e pH 5,32 a 8,68. Para análise cinética, o método numérico de Levenberg-Marquardt foi utilizado para estimar os valores ótimos dos parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten, a fim de ajustá-la aos dados experimentais. Contudo, a concentração inicial de substrato foi a variável que mais influenciou a hidrólise da amoxicilina, seguida da temperatura e pH quadráticos. Ademais, a máxima atividade da PGA foi observada em valores intermediários de temperatura e pH, 38 °C e 7,0 respectivamente. Por fim, o modelo de Michaelis-Menten representou bem a cinética da reação, cujos valores dos parâmetros obtidos indicaram uma boa afinidade da enzima pela amoxicilina.

Palavras-chave: Beta-lactâmicos; Michaelis-Menten; Ácido 6-aminopenicilânico.

ABSTRACT

Water is a natural, finite, vulnerable and indispensable resource for life. However, the presence of chemical substances in the aquatic environment has been increasingly frequent, including in water for public and industrial supply, suggesting an imminent risk to human and environmental health. Among the most common chemical substances in the aquatic environment are pharmaceuticals, including beta-lactam antibiotics, the most prescribed class of antibiotics with the most clinical indications, such as amoxicillin. Therefore, the objective of this work was to evaluate the variables that influence the enzymatic hydrolysis of amoxicillin and its kinetics. For this, a central composite planning was used, in which the variables were analyzed: initial concentration of amoxicillin, temperature and pH in the hydrolysis of the antibiotic. The range of values of the variables studied was 0.16 to 1.84 (% w/v) for the initial concentration of amoxicillin; 26 to 49 °C; and pH 5.32 to 8.68. For kinetic analysis, the Levenberg-Marquardt numerical method was used to estimate the optimal values of the kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation, in order to adjust it to the experimental data. However, the initial substrate concentration was the variable that most influenced the hydrolysis of amoxicillin, and also the quadratic temperature and pH. Furthermore, the maximum PGA activity was observed at intermediate values of temperature and pH, 38 °C and 7.0 respectively. Finally, the Michaelis-Menten model represented well the kinetics of the reaction, whose parameter values indicated a good affinity of the enzyme for amoxicillin.

Keyword: Beta-lactams; Michaelis-Menten; 6-Aminopenicillanic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do anel beta-lactâmico.	17
Figura 2	Fórmula estrutural geral da penicilina.	18
Figura 3	Fórmulas estruturais das penicilinas	18
Figura 4	Possíveis rotas de antibióticos no meio ambiente.	21
Figura 5	Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas.	22
Figura 6	Esquema ilustrando a atividade de uma enzima beta-lactamase, rompendo as ligações que formam o anel beta-lactâmico e neutralizando o antibiótico.	23
Figura 7	Principais métodos de imobilização enzimática.	24
Figura 8	Efeito do pH sobre a taxa reacional das reações enzimáticas.	27
Figura 9	Efeito da temperatura sobre a taxa reacional das reações enzimáticas.	28
Figura 10	Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática em função da concentração do substrato.	30
Figura 11	Cinética básica da equação de Michaelis-Menten.	31
Figura 12	Representação esquematizada do método PDAB para hidrólise da amoxicilina.	34
Figura 13	Curva de calibração.	35
Figura 14	Diagrama de Pareto para a variável de resposta concentração de 6-APA.	37
Figura 15	Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA, em função do PH e temperatura (°C).	39
Figura 16	Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA, em função do PH e concentração inicial de amoxicilina (% p/v).	39
Figura 17	Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA, em função da temperatura e concentração inicial de amoxicilina (% p/v).	40
Figura 18	Análise da Cinética de Michaelis-Menten a 38°C e PH 7,0 com Diferentes Concentrações de Substrato.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações médias de amoxicilina detectadas no Brasil.	20
Tabela 2	Valores ótimos de Temperatura e pH para a Penicilina G Acilase.	28
Tabela 3	Valores reais e codificados das variáveis independentes.	32
Tabela 4	Matriz de Delineamento Composto Central (DCC).	32
Tabela 5	Matriz de Delineamento Composto Central (DCC) com resultados da hidrólise da amoxicilina.	35
Tabela 6	Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta.	38
Tabela 7	Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina catalisada por PGA, para diferentes concentrações do substrato.	40
Tabela 8	Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos pontos experimentais da reação de hidrólise da amoxicilina catalisada por PGA ao modelo de Michaelis-Menten.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PGA	Penicilina G Acilase
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
PDAB	para-Dimetilaminobenzaldeído
Amox	Amoxicilina
$V_{\max}$	Velocidade máxima
K_m	Constante de Michaelis-Menten
R	Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS	16
2.1.1 Penicilinas	17
2.1.1.1 Amoxicilina	19
2.2 AMOXICILINA COMO CONTAMINANTE EMERGENTE	19
2.3 ENZIMAS	21
2.3.1 Classificação	22
2.3.2 Penicilina G Acilase	23
2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	23
2.4.1 Adsorção	24
2.4.2 Ligações Covalentes	25
2.4.3 Aprisionamento	25
2.4.4 Entrelaçamento	26
2.5 SUPORTES	26
2.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA	27
2.6.1 pH ótimo	27
2.6.2 Temperatura Ótima	27
2.6.3 Modelo Cinético de Michaelis-Menten	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
3.2 QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA	33
3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO	34

4.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO NA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA	35
4.3 PARÂMETROS CINÉTICOS	40
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural finito, vulnerável e indispensável à vida. Entretanto, devido ao avanço industrial e tecnológico observado nas últimas décadas, a presença de substâncias químicas no ambiente aquático tem sido cada vez mais frequente, inclusive em águas para o abastecimento público e industrial, sugerindo risco iminente à saúde humana e ambiental (Pires, 2015). Dentre as substâncias químicas mais incidentes no ambiente aquático estão os fármacos. Em todo o mundo, antibióticos, hormônios, anestésicos, anti-inflamatórios, entre outros, são detectados em concentrações preocupantes no esgoto doméstico e em águas superficiais e do subsolo (Bila e Dezotti, 2003).

Os fármacos estão entre os produtos químicos mais fabricados e comercializados no mundo, dentre eles a amoxicilina, devido a sua extensa atuação contra bactérias. Ela pertence à classe de antibióticos beta-lactâmicos e semissintéticos, com estrutura básica da penicilina G. O seu aporte no meio ambiente pode ocorrer via lançamento de efluentes municipais e industriais nos corpos hídricos receptores, *in natura* ou parcialmente tratados, gerando um ciclo de contaminação, devido à capacidade limitada de remoção ou destruição desta substância por processos de tratamento de água tradicionalmente utilizados (Figueiredo et al. 2020).

Oliveira et al. (2015), analisou amostras de água coletadas em dois trechos de um rio que cruza dois municípios da Bahia e constatou que nos pontos da zona urbana a concentração média de amoxicilina chegou a $16,55 \pm 2,10 \text{ mg L}^{-1}$, estes valores podem ser atribuídos principalmente devido a proximidade desse trecho a uma unidade hospitalar, como também por esta área ser um local de lançamento direto de esgoto bruto da cidade (Oliveira et al., 2015). Os resultados dessa pesquisa demonstram sua extensa disseminação geográfica, encontrando-se observáveis em distintos territórios ao redor do globo terrestre. Visto que Gaffney et al. (2013), detectaram cerca de 9 fármacos examinando 22 amostras das águas captadas e distribuídas pela Entidade Gestora de Abastecimento Público em Lisboa. Por sua vez, Huerta-Fontela et al. (2010) constatarem 49 fármacos e 6 metabólitos em amostras de água de estações de tratamento da cidade de Catalunha na Espanha.

Por conseguinte, faz-se necessária a ampliação dos estudos acerca de formas de tratamento de efluentes de maneira efetiva. Figueiredo et al. (2020) avaliaram a cinética de degradação da amoxicilina por hidrólise ácida, básica e pelo aumento de temperatura, onde observou a eficiência do método.

Silva et al. (2021) realizaram um levantamento bibliográfico acerca dos métodos de tratamento de efluentes utilizados para remoção e degradação da amoxicilina e constatou que a maior parte dos estudos selecionados utilizaram as técnicas de adsorção, processos oxidativos avançados, *wetlands*, biorreator com membranas submersas, filtro de carvão ativado e hidrólise química. Porém, apenas o processo tradicional de oxidação com reagente Fenton e o método de remoção por hidrólise alcalina, atingiram a eficiência de 100% da remoção do antibiótico. Em contrapartida, a técnica de remoção do antibiótico por meio de *wetlands* construídos, atingiu a remoção mínima de 15% e os processos oxidativos avançados com fotólise natural obtiveram uma remoção de 24%.

Contudo, há na literatura uma lacuna de estudos que abordam a aplicação da hidrólise enzimática como meio de degradação da amoxicilina. A Penicilina G Acilase (PGA) apresenta potencial para ser utilizada nesse processo, devido a sua habilidade de reconhecer e se ligar à amoxicilina, hidrolisando a ligação beta-lactâmica presente na sua estrutura (Arruda *et al.* 2019).

1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as variáveis que influenciam a hidrólise da amoxicilina em meio aquoso, visando sua remoção de corpos d'água.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da temperatura, pH e concentração inicial de substrato na hidrólise da amoxicilina;
- Usar um planejamento composto central para determinar as condições operacionais ótimas para maximizar a hidrólise do antibiótico; e
- Determinar os parâmetros cinéticos, tais como V_{max} e K_m para analisar a cinética da hidrólise enzimática da amoxicilina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

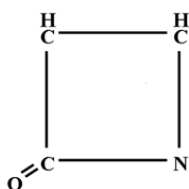
2.1 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas sinteticamente, ou através de

microrganismos, que destroem (bactericidas) ou inibem o crescimento de outros microrganismos (bacteriostáticos) (Miguel, 2013). Eles podem ser classificados em várias categorias com base em suas características químicas, mecanismos de ação e alvos específicos. Dentre as principais, destacam-se os beta-lactâmicos, a classe de antibióticos mais prescrita e com mais indicações clínicas (Danilov, 2021).

Essa classe de antibióticos possui um anel beta-lactâmico em sua estrutura, trata-se de uma amida cíclica (lactama), composto por um átomo de Nitrogênio e três de Carbono, o qual é altamente reativo, podendo conter diversos radicais substituintes que o tornam ativo (Danilov, 2021).

Figura 1 - Representação do anel beta-lactâmico.



Fonte: Azevedo (2014).

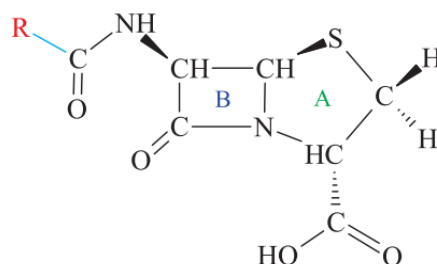
Os antibióticos beta-lactâmicos agem inibindo a síntese do peptidoglicano, um componente crucial na estrutura da parede celular bacteriana. Isso ocorre pela interação do seu anel beta-lactâmico com proteínas chamadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), que inibem a enzima D-alanil-D-alanina transpeptidase, interrompendo a síntese da parede bacteriana. Como resultado, as ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptidoglicano não são formadas, levando à perda de rigidez da parede celular (Miguel, 2013).

2.1.1 Penicilinas

O primeiro antibiótico beta-lactâmico produzido foi a penicilina, descoberta ao acaso em uma das experiências de Alexander Fleming, essa descoberta representou um marco importante na era dos antibióticos, pois a partir dela foi possível diminuir expressivamente o número de mortes causadas por doenças infecciosas durante a segunda Guerra Mundial, levando o governo e a sociedade a se unirem para a produção em massa dessa substância (Calixto e Cavalheiro, 2012).

Sua estrutura básica consiste em um anel tiazolidínico (A) ligado a um anel beta-lactâmico (B), juntos formam o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), ao qual se fixa uma cadeia lateral (R), conforme apresentado na Fig. (2).

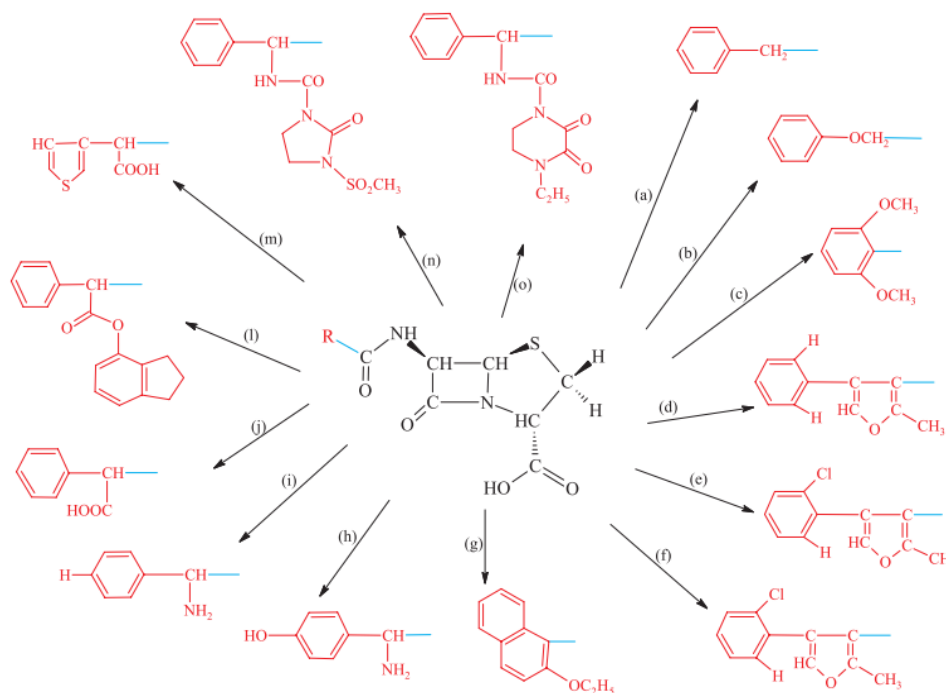
Figura 2 - Fórmula estrutural geral da penicilina.



Fonte: Calixto e Cavalheiro (2012).

Após a descoberta da penicilina, novos antibióticos puderam ser sintetizados através do seu núcleo formador: 6-APA. Partindo dele é possível produzir uma grande quantidade de penicilinas semissintéticas, mediante uma acilação química com os cloretos correspondentes aos ácidos apropriados (Calixto e Cavalheiro, 2012). Conforme apresentado na Fig. (3).

Figura 3- Fórmulas estruturais das penicilinas: Estrutura básica e cadeias laterais substituintes (em vermelho): (a) penicilina G; (b) penicilina V; (c) metecilina; (d) oxacilina, (e) cloxacilina; (f) dicloxacilina, (g) nafcilina; (h) amoxicilina; (i) ampicilina; (j) carbenicilina; (l) indanil-carbenicilina; (m) ticarcilina; (n) mezlocilina; (o) piperacilina.



Fonte: Calixto e Cavalheiro (2012).

As penicilinas apresentam atividade contra inúmeros bacilos e bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mas têm desvantagens tal qual a sua rápida eliminação do organismo e principalmente sua vulnerabilidade a ação das penicilinases, também chamadas de beta-lactamases, enzimas que quebram o anel beta-lactâmico. A quebra do anel beta-lactâmico impede a penicilina de atuar no bloqueio da formação da parede celular de bactérias, não combatendo assim a infecção. Consequentemente, os microrganismos que produzem beta-lactamases são resistentes às penicilinas (Arruda et al. 2019).

2.1.1.1 Amoxicilina

Dentro da classe das penicilinas, a mais prescrita e consumida no mundo é a amoxicilina (Arruda et al. 2019). Trata-se de um antimicrobiano beta-lactâmico, cuja ação é bactericida, ou seja, interfere na síntese da parede celular das bactérias impedindo seu crescimento (REIS, 2015). Em comparação aos demais antibióticos penicilânicos, a amoxicilina, apresentada na Fig. (3)-(h), apresenta uma semelhança estrutural com a ampicilina, apresentada na Fig. (3)-(i), cuja estruturas divergem apenas devido à presença de uma hidroxila acoplada ao anel benzênico.

A amoxicilina atua tanto no combate das bactérias Gram-positivas aeróbias, tais quais *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, quanto nas Gram-negativas, exemplificadas por *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori* (Oliveira, 2017). A sua absorção quando administrada por via oral gira em torno de 80% e não é alterada pelos alimentos. Ademais, é eliminado na forma ativa principalmente na urina (70 a 80%) e na bile (5 a 10%) (Barcelona, 2008). Portanto, é um dos micropoluentes que são encontrados em diversas estações de tratamento bem como bacias hídricas onde são despejados efluentes.

2.2 AMOXICILINA COMO CONTAMINANTE EMERGENTE

Com o aumento progressivo da utilização de antibióticos, tanto por seres humanos quanto por animais, eles têm conquistado maior proeminência na comunidade científica e sua destinação final tem sido objeto frequente de estudos. Diversas pesquisas têm indicado que existem vestígios de amoxicilina em estações de tratamento de efluentes e nas águas naturais, conforme apresentado na Tab. (1).

Tabela 1 - Concentrações médias de amoxicilina detectadas no Brasil.

Concentração média	Localização	Referência
1,284 (ng L ⁻¹)	Águas superficiais da bacia de Atibaia, SP.	Locatelli <i>et al.</i> (2011)
3,70 ± 0,15 (mg L ⁻¹)	Nascente - rio Verruga Vitória da Conquista, BA.	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
16,55 ± 2,10 (mg L ⁻¹)	Zona Urbana - rio Verruga Vitória da Conquista, BA.	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
11,24 ± 1,40 (mg L ⁻¹)	Zona Urbana - rio Verruga Vitória da Conquista, BA.	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
1,50 ± 0,30 (mg L ⁻¹)	Estação de Tratamento - rio Verruga Vitória da Conquista, BA.	Oliveira <i>et al.</i> (2015)
1,10 ± 0,08 (mg L ⁻¹)	rio Água Fria Barra do Choça, BA. reservatório de águas	Oliveira <i>et al.</i> (2015)

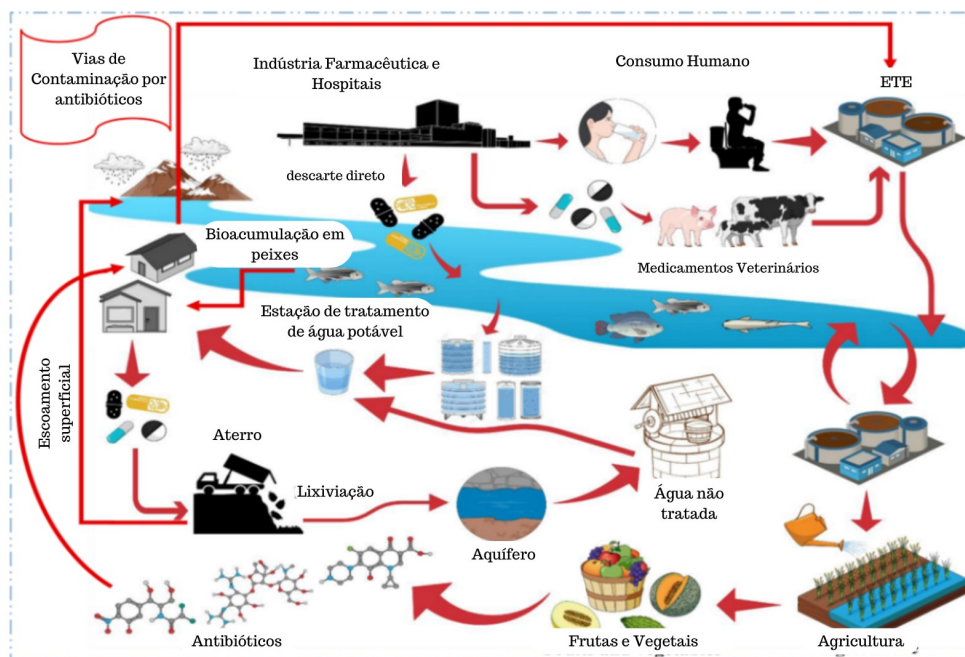
Fonte: Autor, 2023.

Através de uma análise dos dados apresentados na Tab. (1), pode-se observar que as maiores concentrações de amoxicilina se encontram nos pontos da zona urbana, estes valores podem ser atribuídos devido principalmente a proximidade desse trecho a uma unidade hospitalar, como também por esta área ser um local de lançamento direto de esgoto bruto da cidade (Oliveira *et al.*, 2015). Considerando que cerca de 80 a 90% dos antibióticos consumidos são excretados por seres humanos e animais, principalmente na forma de metabólitos, devido à absorção parcial em seus corpos (Bautitz e Nogueira, 2007).

Resíduos de antibióticos são comumente gerados em áreas residenciais, hospitalares, indústrias, fazendas de animais e finalmente chegam às estações de tratamento de efluentes (ETE). O lodo gerado pelas ETes também contém resíduos de antibióticos e é descartado em aterros ou utilizado como condicionador de solo em terras agrícolas. Ademais, resíduos (líquidos/sólidos) de unidades farmacêuticas, ou derramamentos acidentais durante a produção e o transporte de antibióticos, também podem ser considerados fontes de contaminação no meio ambiente. Além disso, o descarte direto da aquicultura (piscicultura) e produção de aves, representam uma via importante de contaminação por antibióticos (Bhagat *et al.* 2020). No geral, a contaminação por antibióticos ocorre de forma circular, afetando

diversas rotas, incluindo a cadeia alimentar e processos de bioacumulação e biomagnificação. A Fig. (4) ilustra como eles entram em diferentes ecossistemas e retornam à origem, seguindo um ciclo de contaminação.

Figura 4 - Possíveis rotas de antibióticos no meio ambiente.



Fonte: Adaptada de Bhagat et al. (2020).

Portanto, dentre os efeitos da presença de amoxicilina no meio ambiente aquático, destaca-se o desenvolvimento de resistência bacteriana, que resulta de mutações em organismos expostos aos resíduos desses fármacos (OMS, 2014). Adicionalmente, é importante considerar os processos de bioacumulação e biomagnificação, nos quais a amoxicilina se acumula em organismos aquáticos e é disseminada ao longo da cadeia alimentar, potencialmente resultando em concentrações perigosas nos consumidores finais. Além disso, a exposição de organismos aquáticos à amoxicilina pode causar efeitos tóxicos e sub-letais, incluindo alterações no comportamento, crescimento, reprodução e até mesmo mortalidade dos animais aquáticos (Yang, 2019).

2.3 ENZIMAS

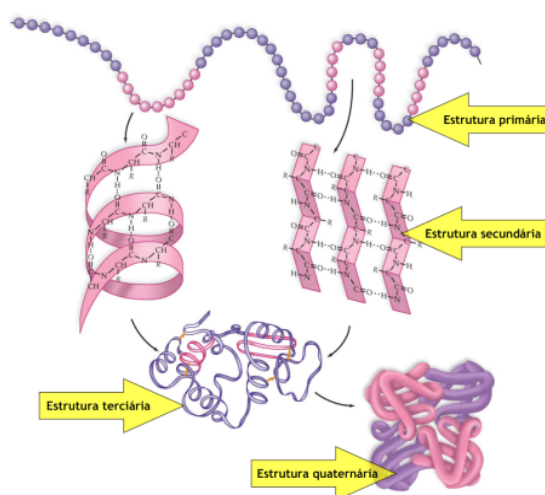
Uma das formas potenciais para eliminar a amoxicilina contaminante presente no ambiente aquático pode ser através de enzimas. Elas desempenham um papel vital como

agentes catalíticos em reações químicas, constituindo uma necessidade fundamental para o metabolismo de todos os organismos vivos (Orlandelli, 2012).

As enzimas exibem uma estrutura molecular notavelmente complexa, composta principalmente por uma porção proteica que pode se associar a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Esses heteropolímeros são construídos a partir de aminoácidos que estão covalentemente ligados por ligações peptídicas (Bhagat et al. 2020).

De acordo com Orlandelli (2012), as enzimas têm uma estrutura complexa a qual, conforme apresentado na Fig. (5), pode ser dividida em quatro níveis de organização estrutural: a estrutura primária que corresponde a sequência de aminoácidos; a secundária que representa a disposição espacial resultante da interação entre esses aminoácidos, formando arranjos como α -hélices e folhas β -pregueadas; a estrutura terciária, definida pelas interações entre aminoácidos que não estão sequencialmente próximos uns dos outros, resultando em torções e dobramentos específicos; e, por último, há uma estrutura quaternária, resultante da interação entre várias cadeias polipeptídicas, aumentando a complexidade tridimensional.

Figura 5 - Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas.



Fonte: Cientic, 2023.

2.3.1 Classificação

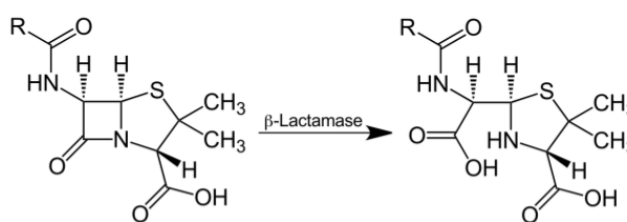
Segundo Sant'anna (2001), as enzimas podem ser divididas em seis classes, conforme as reações que catalisam: oxidoredutases (catalisam reações de óxido-redução); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se

em um produto isômero); e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia).

2.3.2 Penicilina G Acilase

As beta-lactamases, também conhecidas como penicilinases, fazem parte da classe de enzimas conhecida como hidrolases (Cunha, 2019). O papel dessa enzima é quebrar o anel beta-lactâmico presente nos antibióticos beta-lactâmicos, conforme esquema apresentado na Fig. (6), tornando-os inativos e, portanto, conferindo resistência a esses medicamentos em certas bactérias (Orlandelli, 2012).

Figura 6 - Esquema ilustrando a atividade de uma enzima beta-lactamase, rompendo as ligações que formam o anel beta-lactâmico e neutralizando o antibiótico.



Fonte: Cientic, 2023.

As beta-lactamases podem apresentar diferentes estruturas químicas e, consequentemente, diferentes espectros de atividade. Alguns tipos neutralizam apenas alguns tipos de beta-lactâmicos, enquanto outros são capazes de vencer praticamente todos os antibióticos do grupo (Teklu et al., 2019).

A maneira mais tradicional de classificar as beta-lactamases é de acordo com as sequências de aminoácidos das moléculas que as compõem. Essa é a chamada classificação de Ambler, que divide as beta-lactamases em 4 grupos: A, B, C e D. As classes A, C e D têm base em serina, enquanto a B é metalo-beta-lactamase (MBL) (Cunha, 2019).

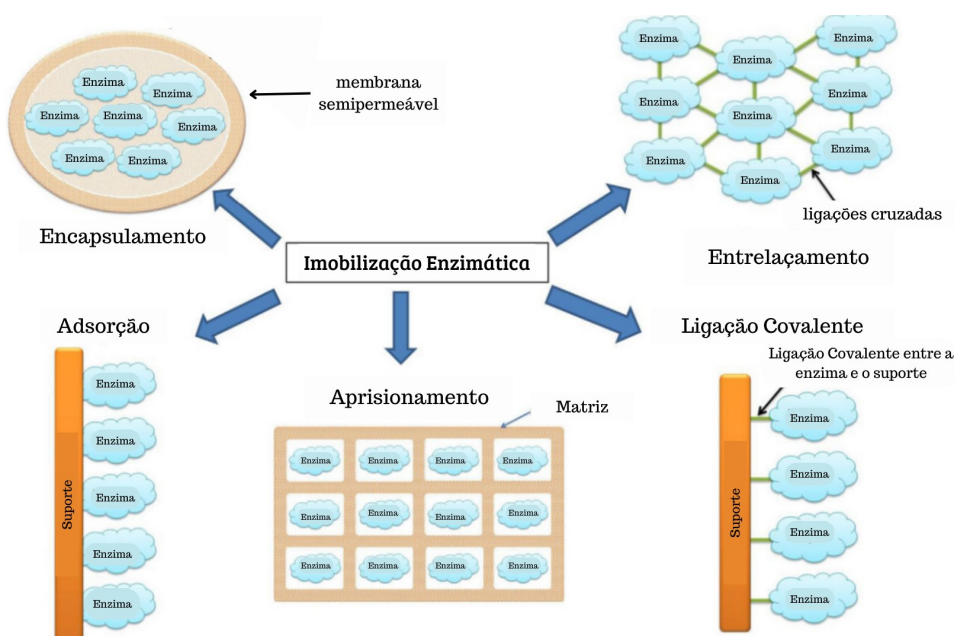
2.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A estabilidade estrutural de algumas enzimas durante qualquer reação bioquímica é essencial e altamente desafiadora. Para superar essas limitações, a imobilização deste biocatalisador apresenta-se como uma alternativa promissora, apesar de seu alto custo (Sirisha, 2016). Contudo, este processo pode gerar maior resistência das enzimas às condições

adversas dos meios reacionais, tornando-a mais estável; possibilitar o reaproveitamento deste biocatalisador; reduzir os custos e retirá-lo do produto final (Ralbovsky e Smith, 2021).

De acordo com Lima (2001), a imobilização de uma enzima pode ser definida como o confinamento das suas moléculas a uma matriz ou suporte sólido, diferente daquele em qual substrato ou produtos estão presentes. É importante destacar que as moléculas do substrato e os produtos formados devem mover-se livremente para dentro e para fora da fase à qual as enzimas estão restringidas (Sirisha, 2016). Existem diferentes métodos de imobilização enzimática e os principais foram apresentados na Fig. (7).

Figura 7 - Principais métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Adaptada de Sirisha (2016).

2.4.1 Adsorção

Este método consiste na união entre a molécula enzimática e um suporte inerte através de ligações eletrostáticas, estabelecidas entre grupos de cargas opostas (Lima, 2001). Em que a enzima é dissolvida em solução e então colocada em contato com um suporte sólido por um período de tempo fixo, sob condições adequadas, sem que perca sua atividade. A ligação da enzima com o suporte se dá através de ligações do tipo van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Zerbini, 2020). No entanto, devido às fracas ligações entre a enzima e o suporte, algumas condições fisiológicas adversas, tais como alta temperatura ou pH, podem enfraquecer a ligação entre a enzima e o suporte (Spahn e Minteer, 2008).

Contudo, a matriz dos suportes pode ser de materiais orgânicos e inorgânicos (Lima, 2001). De acordo com Sirisha (2016), os materiais de matriz mais comumente usados são compostos de polissacarídeos, vidro e polímeros sintéticos. Ademais, as fibras de coco apresentam potencial para esse papel, devido ao seu potencial de retenção de água e à melhor política de troca catiônica. Assim como o caulim, outra matriz ecologicamente correta, que após acetilação, apresentou alta rentabilidade enzimática.

2.4.2 Ligação Covalente

A enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes que normalmente são estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel benzênico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte. Em geral, a reação é feita em meio aquoso em uma faixa de temperatura de 0°C a 25°C e pH próximo a neutralidade (Lima, 2001).

Neste método, existe um risco considerável de desnaturação enzimática, já que a maioria das enzimas necessitam de modificações químicas para adquirir o grupo funcional. No entanto, essa abordagem aumenta a estabilidade da enzima em detrimento de sua atividade, sendo empregada quando não é necessária a presença da enzima no produto final (Zerbini, 2020).

2.4.3 Encapsulamento

Neste método, a enzima não é presa diretamente ao suporte, ela é, primeiramente, aprisionada em uma rede polimérica, a qual permite apenas o fluxo de substratos e produtos, restringindo a difusão da enzima (Zerbini, 2020). Portanto, primeiro há a mistura da enzima com uma solução monomérica, seguida da polimerização dessa solução monomérica por meio de uma reação química, não ocorrendo interação química entre a enzima e o polímero. Após ativado, o suporte passa a reagir com as enzimas, resultando na formação de uma matriz polimérica que se tornará uma estrutura de aprisionamento para esses biocatalisadores (Neto, 2023).

Assim como em outros métodos de imobilização, o encapsulamento permite uma resistência mais ampla à variação de pH, controle de polaridade, afinidade e outras propriedades deste material para aumentar o seu poder catalítico. Entretanto, possui algumas desvantagens como, uma possível dificuldade do substrato atingir o sítio ativo da enzima e a

possibilidade dela escapar da estrutura polimérica, se os poros da matriz forem muito grandes (Zerbini, 2020). Quanto aos materiais utilizados neste tipo de imobilização, é possível citar o colágeno, gelatina, poliuretano e alginato (Wahab, 2019).

De acordo com Lima (2001), o procedimento clássico consiste em dissolver a enzima em uma solução aquosa de alginato de sódio, que é gotejada sobre uma solução aquosa contendo íons bivalentes. Tão logo, a gota de alginato de sódio entra em contato com a solução salina, forma-se uma esfera dentro da qual a enzima fica retida, cuja membrana é constituída pelo polímero de alginato de cálcio.

2.4.4 Entrelaçamento

A técnica de *cross-linking* é uma imobilização irreversível e não requer suporte (Hong, 2021). Neste método, a ligação é mútua entre as enzimas, mas também podem ocorrer ligações com proteínas inativas, formando estruturas tridimensionais complexas (Guajardo e Ahumada, 2021). São ligações covalentes e requerem o auxílio de um reagente que realiza essas ligações. O glutaraldeído destaca-se como um dos mais utilizados nesta técnica devido ao seu baixo custo e disponibilidade (Sheldon, 2011).

A ligação com grupos específicos de aminoácidos das enzimas só é possível devido à presença de pelo menos duas extremidades interagentes nas moléculas que são os agentes de reticulação (Hong, 2021). Contudo, trata-se de uma técnica trabalhosa e requer muito tempo, além da potencial perda de metade da atividade enzimática, redução da estabilidade mecânica e baixa reprodutibilidade, principalmente quando se trabalha com muitas enzimas (Jia *et al.*, 2017).

2.5 SUPORTES

É de extrema importância garantir a preservação da estrutura conformacional e da atividade específica da enzima ao realizar a imobilização, evitando a sua desativação quando em contato com a superfície do suporte (Rodrigues, 2019). Consequentemente, faz-se necessária a escolha adequada de um suporte.

Em termos de sua estrutura, os suportes sólidos podem ser categorizados como porosos e não porosos (Chen *et al.*, 2020). Quanto à sua composição química, esses suportes sólidos podem ser divididos em materiais orgânicos e inorgânicos (Lou *et al.*, 2021). A escolha do tipo de suporte dependerá essencialmente de dois fatores: características peculiares

da enzima e condições de uso da enzima imobilizada. Na literatura existem inúmeros materiais inertes que podem ser usados para imobilizar enzimas, tais quais: vidro, sílica, aço, triacetato de celulose, poliacrilamida alumina etc (Lima, 2001).

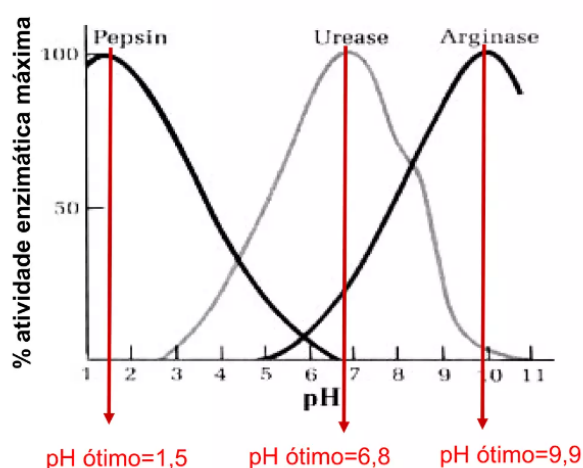
2.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA

2.6.1 pH ótimo

Todas as enzimas são sensíveis às variações da concentração de hidrogênio no meio reacional. Em geral, elas são ativas apenas em uma faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo bem definido, conforme apresentado na Fig. (8).

A estrutura tridimensional da enzima é estabilizada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto. Mudanças no pH alteram a concentração de hidrogênio, afetando o equilíbrio dessas forças e podendo desativar irreversivelmente a enzima. Como consequência, ocorre a perda de sua atividade biológica (Oguri, 2006).

Figura 8 - Efeito do pH sobre a taxa reacional das reações enzimáticas.



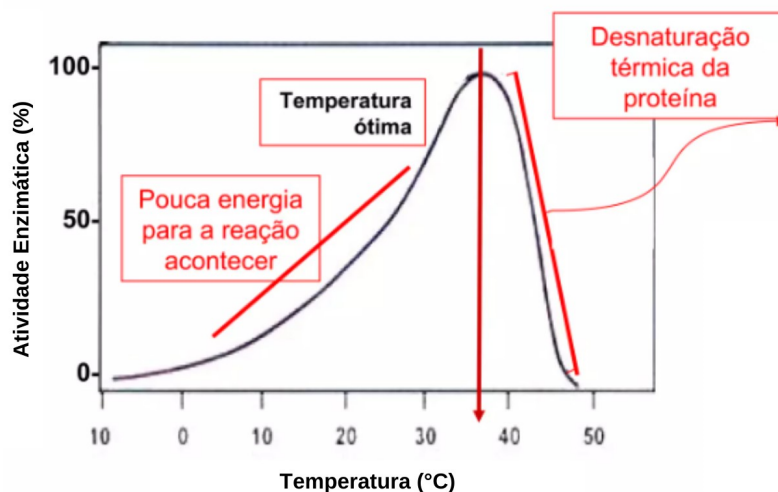
Fonte: Carlini, 2014.

2.6.2 Temperatura Ótima

A atividade enzimática é altamente dependente da temperatura, tal qual um catalisador convencional. Todavia, o aumento dessa variável em uma reação enzimática pode gerar dois efeitos simultâneos: a taxa de reação aumenta, devido ao aumento da frequência

das colisões entre o substrato e a enzima; e em contrapartida, a estabilidade da enzima decresce, devido à sua desnaturação. Isto posto, a curva da taxa de reação em função da temperatura apresenta normalmente o formato de sino, conforme apresentado na Fig. (9).

Figura 9 - Efeito da temperatura sobre a taxa reacional das reações enzimáticas.



Fonte: Carlini, 2014.

Através de uma breve pesquisa na literatura, foi possível obter os valores ótimos das variáveis pH e temperatura ótimos, para a PGA proveniente de diferentes microrganismos, conforme apresentado na Tab. (2).

Tabela 2 - Valores ótimos de Temperatura e pH para a Penicilina G Acilase.

Microrganismo	T _{ótima} (°C)	pH _{ótimo}	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	30	7,0	(Oguri, 2006)
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,0	(Illanes <i>et al.</i> , 1994)
<i>Escherichia coli</i>	37	8,0	(Savidge e Cale, 1975)
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,7	(Savidge e Cale, 1975)
<i>Escherichia coli</i>	37	7,8	(Shewale e Sivaraman, 1989)
<i>Khuyvera citrophila</i>	37	8,0	(Álvaro <i>et al.</i> , 1992)
<i>Khuyvera citrophila</i>	55	8,5	(Wen <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i>	37	7,8	(Xue-Jun, 2004)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	35	10,0	(Sue, 2011)

Fonte: Autor, 2023.

2.6.3 Modelo Cinético de Michaelis-Menten

Conforme estabelecido pela equação de Michaelis e Menten, em uma reação enzimática que envolve um único substrato, a enzima livre (E) e o substrato (S) mantêm um equilíbrio contínuo com o complexo (ES) durante todo o curso da reação, conforme apresentado na Eq.(1).



A primeira equação descreve uma simples dissociação, enquanto a transformação do complexo (ES), como expresso na segunda equação, é um processo consideravelmente mais lento do que a dissociação. Em outras palavras, a constante k_2 é significativamente menor que k_1 . Portanto, a velocidade de formação do produto não depende da taxa de formação do complexo ES , mas sim da taxa de sua decomposição. Em resumo,

$$v = k_2[ES] \quad (2)$$

A constante de dissociação (K_s) do complexo (ES) pode facilmente ser determinada, pois corresponde ao inverso da constante de equilíbrio desta equação e recebeu a designação de constante de Michaelis (K_m):

$$K_s = K_m = \frac{K_{-1}}{K_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

A partir da suposição da conservação da enzima, o balanço de massa para a enzima total adicionada ao sistema reacional é mostrado na Eq. (4).

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (4)$$

Combinando a Eq. (4) com a equação (3):

$$K_m = \frac{([E_T] - [ES])[S]}{[ES]} \quad (5)$$

Isolando a concentração do complexo (ES):

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Substituindo a Eq. (6) na (2):

$$v = k_2 \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Quando a concentração de substrato for muito elevada, pode-se considerar que a concentração da enzima na sua forma combinada (ES) e livre (E) em solução são constantes, pois a enzima fica saturada de substrato, logo pode-se aproximar essa cinética a estado estacionário. Portanto, do ponto de vista teórico, podemos considerar:

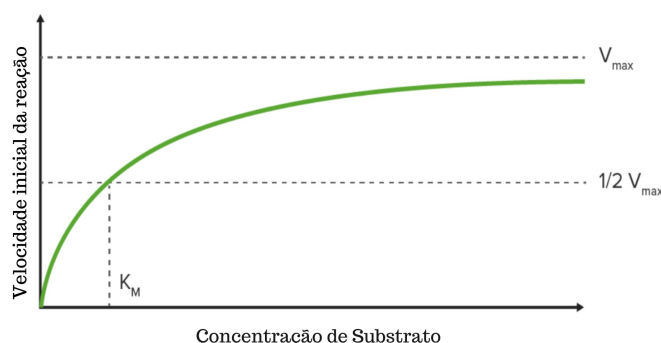
$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[E]}{dt} \cong 0 \quad (8)$$

Logo, através da Eq. (4) e da equação (8), observa-se que a concentração de enzimas total (E_T) também pode ser considerada constante. Então, obtém-se finalmente a equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Conforme é possível observar na Fig. (10), ao plotar um gráfico de v_0 vs. $[S]$, obtém-se uma curva hiperbólica regular, que se aproxima da velocidade máxima $v_{m\acute{a}x}$ em altas concentrações de substrato, devido à saturação da enzima com ele.

Figura 10 - Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática em função da concentração do substrato.



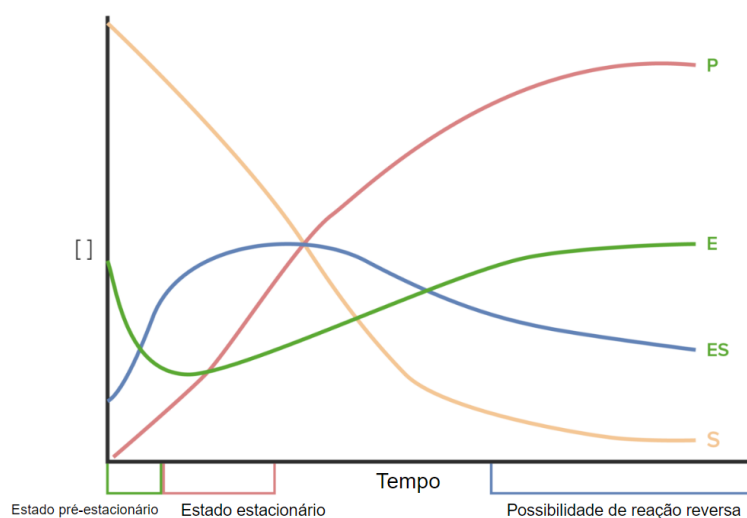
Fonte: Lecturio, 2023.

A constante K_m indica a afinidade de uma enzima para o seu substrato de maneira inversa e é característica do complexo enzima-substrato específico. Se o seu valor for baixo, significa que a enzima tem uma forte afinidade pelo substrato e menos dele será necessário para atingir metade da velocidade máxima. Porém, se for alto, a enzima tem menos afinidade pelo substrato e mais dele é necessário para atingir metade da velocidade máxima. Trata-se de uma variável dependente da temperatura e do valor do pH, mas independente da concentração da enzima (Ferreira, 2014).

Contudo, de acordo com a cinética apresentada na Fig. (11), no início de uma reação enzimática as concentrações de Enzima $[E]$ e Substrato $[S]$ são altas, ao passo que as concentrações do complexo Enzima-Substrato $[ES]$ e produto $[P]$ são reduzidas. Conforme a reação avança, $[ES]$ e $[P]$ aumentam, enquanto $[E]$ e $[S]$ diminuem. Conforme $[S]$ diminui, também ocorre uma redução na formação de $[ES]$ no estágio final da reação. Nesse ponto, a

ocorrência de uma reação inversa torna-se mais provável.

Figura 11 - Cinética básica da equação de Michaelis-Menten.



Fonte: Lecturio, 2023.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho, foi aplicado um planejamento composto central (DCC) para avaliar o efeito da aplicação das variáveis independentes na hidrólise enzimática da amoxicilina. As variáveis independentes consideradas foram: concentração inicial de substrato (amoxicilina), temperatura e pH do meio reacional. Por outro lado, a variável dependente foi a concentração de 6-APA. No total, foram realizados 25 experimentos, sendo 8 pontos fatoriais com duas réplicas; 6 estrelas; e 3 réplicas no ponto central. Os níveis e faixa experimental considerados foram apresentados na Tab. (3).

A distância entre os pontos axiais (estrela) e o ponto central foi calculada através da expressão $\alpha = 2^{(n/4)}$, em que “n” é o número de fatores. Portanto, considerando os três fatores supracitados: $\alpha = 1,682$. Ademais, a matriz de delineamento foi apresentada na Tab. (4).

Tabela 3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes.

Variável independente	níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
$C_{Inicial}^{Amoxicilina}$ % (p/v) (x_1)	0,16	0,50	1,00	1,50	1,84
T (°C) (x_2)	26,23	31	38	45	49,77
pH (x_3)	5,32	6,0	7,0	8,0	8,68

Fonte: Autor, 2023.

Tabela 4 - Matriz de Delineamento Composto Central (DCC).

Exp.	variáveis independentes		
	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	$-\alpha$	0	0
10	$+\alpha$	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	$+\alpha$	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	$+\alpha$
15	0	0	0

Fonte: Autor, 2023.

O comportamento do sistema discutido foi descrito por uma equação quadrática, Eq. (10), conforme (Silva *et. al* 2011). A regressão foi realizada através do software Statistica versão 7.0 e os valores ótimos das variáveis selecionadas foram obtidos através da resolução da equação de regressão para posterior análise das superfícies de resposta geradas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \quad (10)$$

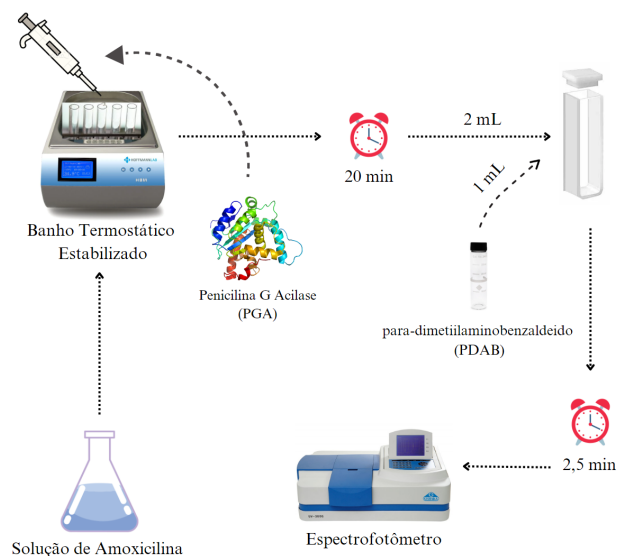
Em que Y é a resposta estimada; β_0 , β_j , β_{ij} e β_{jj} coeficientes constantes; x_i e x_j são as variáveis independentes codificadas ou fatores; e ε é o erro aleatório.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA

A concentração de ácido 6-aminopenicilânico foi realizada usando o método PDAB. Ele consiste em determinar a atividade amidase da PGA utilizando o reagente p-dimetilamino benzaldeído (PDAB) de acordo com o protocolo proposto por Balasingham *et al.*, (1972). O grupo amino presente no 6-APA, produzido na reação de hidrólise da amoxicilina catalisada pela PGA, reage com o grupo aldeído presente no PDAB, gerando um produto colorido que foi acompanhado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 415 nm.

Para executar este método, tubos de ensaio foram preenchidos com a solução de amoxicilina, cujo solvente foi uma solução de tampão fosfato 100 mM. Sendo a concentração de amoxicilina, temperatura e o pH da solução, selecionados conforme requerido pelo planejamento experimental apresentado na Tab. (4). Em seguida, os tubos contendo a solução de substrato foram adicionados em um banho termostatizado ajustado e estabilizado na temperatura planejada. Na sequência, a PGA da *Escherichia coli* recombinante, produzida e imobilizada industrialmente, foi adicionada ao meio reacional e deixada para reagir por 60 minutos, retirando-se alíquotas de 1,0 mL a cada 20 minutos de reação. Por fim, as alíquotas foram adicionadas em cubetas previamente preparadas com o reagente PDAB e após reagir por 2,5 minutos, realizou-se a medida da absorbância. A concentração de 6-APA foi obtida a partir de uma curva de calibração, construída através da medição da absorbância de diferentes concentrações de 6-APA em 415 nm. Contudo, uma representação esquematizada deste método foi apresentada na Fig. (12).

Figura 12 - Representação esquematizada do método PDAB para hidrólise da amoxicilina.



Fonte: Autor, 2023.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

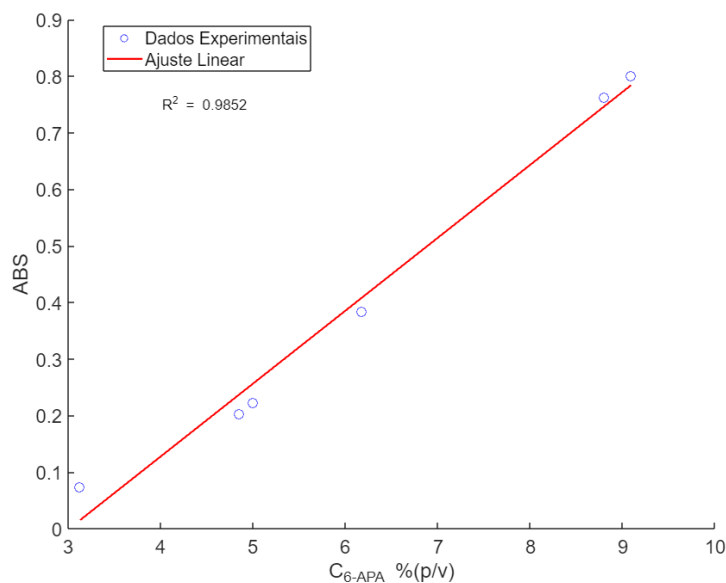
A influência da concentração de substrato na atividade da PGA foi investigada tomando-se as velocidades iniciais da hidrólise da amoxicilina em diferentes concentrações, entre 4,3787 a 50,3557 mM, diluídas em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 e 38°C. A tangente da curva da concentração de produto liberado em função do tempo de reação, determinada para o trecho linear, foi tomada como a velocidade inicial para cada concentração de substrato. O ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos pontos experimentais obtidos do gráfico de velocidades iniciais versus concentração de amoxicilina forneceu os parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m , sendo ele realizado através do método numérico de regressão não linear de Levenberg-Marquardt, para que a diferença entre os dados experimentais obtidos e os previstos pelo modelo seja mínima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A concentração de 6-APA no meio reacional foi obtida através da curva de calibração apresentada na Fig. (13).

Figura 13 - Curva de calibração.



Fonte: Autor, 2023.

4.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO NA HIDRÓLISE DA AMOXICILINA

O modelo resultante do planejamento fatorial mostrou que a concentração inicial do substrato e a temperatura foram as variáveis mais significativas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tab. (5), em que nota-se que a concentração mais elevada de 6-APA, que representa a maior hidrólise do antibiótico, foi alcançada no sexto ensaio, quando a concentração de amoxicilina estava em seu nível mais alto. Isso sugere que uma maior concentração do antibiótico favoreceu a sua hidrólise. Os maiores valores de 6-APA foram observados nos ensaios 5, 6 e 7. Estes resultados foram observados em valores altos e baixos de pH e temperatura, indicando que os valores máximos de hidrólise do antibiótico ocorreram em valores intermediários dessas variáveis.

Tabela 5 - Matriz de Delineamento Composto Central.

Exp.	variáveis independentes			resultado
	x_1	x_2	x_3	C_{6-APA} % (p/v)
1	-1	-1	-1	$0,5538 \pm 0,1667$
2	-1	-1	+1	$0,5666 \pm 0,0769$
3	-1	+1	-1	$0,5227 \pm 0,0073$
4	-1	+1	+1	$0,3583 \pm 0,0481$
5	+1	-1	-1	$4,6348 \pm 0,3951$
6	+1	-1	+1	$5,0506 \pm 0,2404$
7	+1	+1	-1	$4,4352 \pm 0,1122$
8	+1	+1	+1	$3,9865 \pm 0,5609$
9	$-\alpha$	0	0	0,2333
10	$+\alpha$	0	0	3,3615
11	0	$-\alpha$	0	1,0666
12	0	$+\alpha$	0	0,3423
13	0	0	$-\alpha$	0,6692
14	0	0	$+\alpha$	1,0858
15	0	0	0	$2,8352 \pm 0,4141$

Fonte: Autor, 2023.

Ao aplicar a análise de regressão aos dados apresentados na Tab. (5), a Eq. (10) foi ajustada aos resultados experimentais do planejamento fatorial. Com isso, foi possível obter os parâmetros da equação com os efeitos significativos com um nível de 95% de intervalo de confiança. Conforme apresentado na Eq. (14).

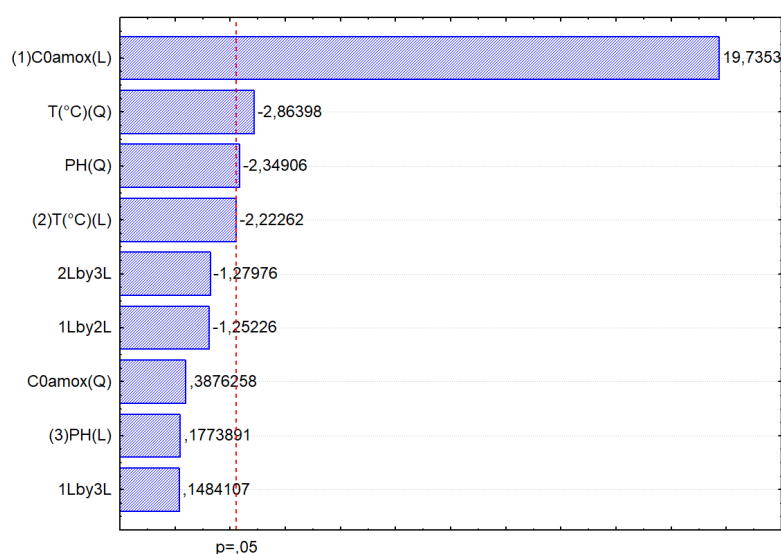
$$Y_{C_{6-APA}} = -29,454 + 8,868x_1 - 0,014x_2^2 - 0,095x_3^2 \quad (14)$$

$(\pm 0,2349)$ $(\pm 0,0876)$ $(\pm 0,0021)$ $(\pm 0,0021)$

O coeficiente de determinação (R^2), parâmetro que fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas,

apresentou o valor de 0,814 na Eq. (14). Outrossim, ao analisar o diagrama de Pareto apresentado na Fig. (14), foi possível determinar quais coeficientes do modelo realmente apresentaram influência estatística com significância de 5%. Com base nessa análise, concluiu-se que o coeficiente de maior relevância para a variável de resposta foi a concentração inicial linear de amoxicilina (x_1). Ademais, também apresentaram influência significativa no modelo, a temperatura do meio reacional (x_2) na forma quadrática, assim como, o pH do meio reacional (x_3) na forma quadrática.

Figura 14 - Diagrama de Pareto para a variável de resposta concentração de 6-APA.



Fonte: Autor, 2023.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) foram descritos na Tab. (6) e através dela foi possível realizar o teste F. Sempre que este parâmetro for maior que uma unidade, a regressão é estatisticamente significativa e existe uma relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor deve ser no mínimo quatro vezes superior (Santos, 2008).

Neste trabalho, o modelo apresentado na Eq. (14) tem um valor de $F_{\text{calculado}}$ igual a 389,4848 para a variável x_1 linear; 8,2024 para x_2 quadrático; e 5,5181 para x_3 quadrático. Indicando que o modelo é estatisticamente significativo com 95% de confiança. Ademais, o valor-p para as mesmas variáveis foi abaixo de 0,05, reforçando essa afirmação e indicando que a hipótese nula deve ser rejeitada, pois houve diferença significativa entre as respostas ao variar os fatores estudados. As demais variáveis e suas possíveis combinações não apresentaram efeitos significativos no modelo, com base no teste F e no valor-p, e por esse

motivo foram desconsideradas.

Tabela 6- Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F _{Calculado}	p
x_1 (Linear)	64,82086	1	64,82086	389,4848	0
x_1 (Quadrático)	0,02501	1	0,02501	0,1503	0,706416
x_2 (Linear)	0,82216	1	0,82216	4,94	0,05047
x_2 (Quadrático)	1,3651	1	1,3651	8,2024	0,016842
x_3 (Linear)	0,00524	1	0,00524	0,0315	0,862744
x_3 (Quadrático)	0,91836	1	0,91836	5,5181	0,040706
$x_1 * x_2$	0,26098	1	0,26098	1,5682	0,23897
$x_1 * x_3$	0,00367	1	0,00367	0,022	0,884969
$x_3 * x_2$	0,27257	1	0,27257	1,6378	0,229523
Resíduo	15,6157	15	2,95757		
Total	84,03182	24			

Fonte: Autor, 2023.

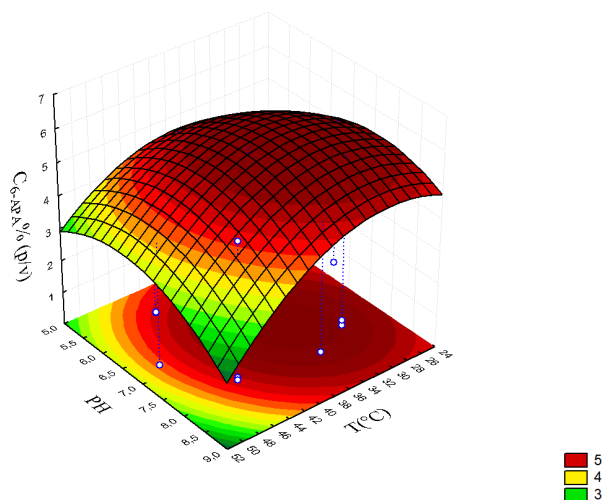
O uso do método de análise por superfície de resposta (MSR) permite estimar os níveis mais representativos para os resultados esperados. Têm-se como valores ideais para as variáveis independentes em estudo, aqueles que possibilitem identificar a maior concentração de 6-APA no meio reacional, de modo que mais antibiótico seja hidrolisado e não permaneça nos corpos d'água.

As superfícies de resposta geradas a partir da análise estatística dos resultados da concentração de 6-APA, variando a concentração inicial de substrato (amoxicilina), pH e temperatura foram apresentadas nas figuras 15 a 17. Na Fig. (15), observa-se que fixando o pH, a concentração de 6-APA diminuiu com o aumento da temperatura. Além disso, observa-se que as variações na concentração de 6-APA não foram lineares, evidenciando que há um ponto de ótimo para as variáveis estudadas, de forma a aumentar a hidrólise da amoxicilina.

Com isso, foi possível inferir que os valores intermediários de pH e inferiores e intermediários de temperatura combinados, apresentaram a maior concentração de 6-APA. Em temperaturas elevadas, a hidrólise do antibiótico foi desfavorecida principalmente nos limites de pH. Por outro lado, os valores intermediários de pH, combinados com altas temperaturas, apresentaram um melhor desempenho na hidrólise, evidenciando que o pH próximo a neutralidade favorece a hidrólise mesmo em altas temperaturas. Esse

comportamento é interessante e ajuda no controle da operação de um processo de retirada de antibióticos de corpos d'água.

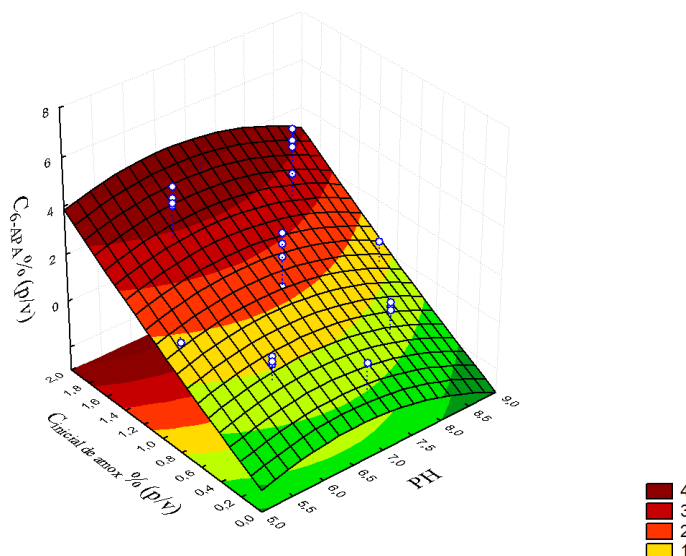
Figura 15- Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA em função do pH e temperatura (°C).



Fonte: Autor, 2023.

Através da Fig. (16), pode-se analisar que a concentração de 6-APA diminuiu linearmente com a redução da concentração inicial de amoxicilina. Outrossim, para o pH foi observado um comportamento similar ao apresentado na Fig. (15), em que os maiores valores de concentração de 6-APA foram obtidos nos valores intermediários de pH, principalmente quando combinados com altas concentrações de amoxicilina.

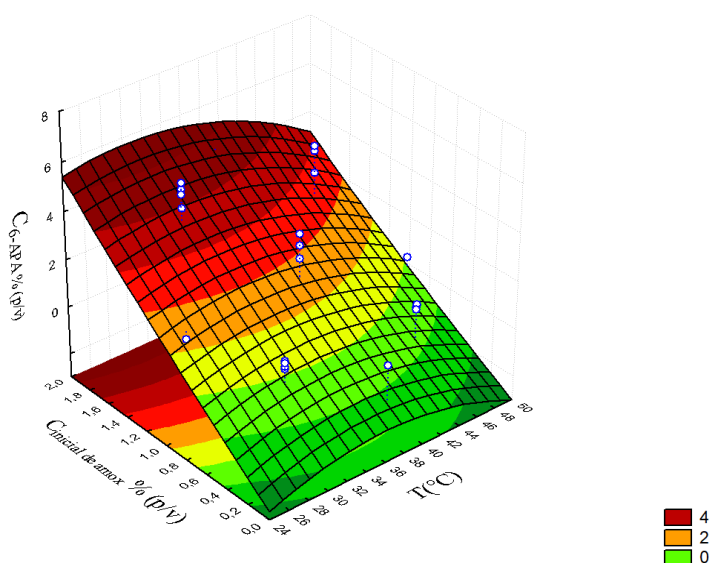
Figura 16- Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA, em função do pH e concentração inicial de amoxicilina.



Fonte: Autor, 2023.

Através da Fig. (17), foi possível observar que as altas concentrações de 6-APA foram observadas em altas concentrações iniciais de amoxicilina e valores intermediários e baixos de temperatura, logo, foi possível concluir que em altas concentrações iniciais de amoxicilina a temperatura não apresentou muita influência na hidrólise do antibiótico.

Figura 17- Superfícies de resposta para a concentração de 6-APA em função da temperatura e concentração inicial de amoxicilina.



Fonte: Autor, 2023.

4.3 PARÂMETROS CINÉTICOS

O efeito da concentração de substrato na atividade da PGA foi analisado tomando-se as velocidades iniciais da reação de hidrólise da amoxicilina em diferentes concentrações. Em que as variáveis foram mantidas constantes em pH 7,0 e 38°C. As velocidades iniciais para as diferentes concentrações do substrato foram apresentadas na Tab. (7).

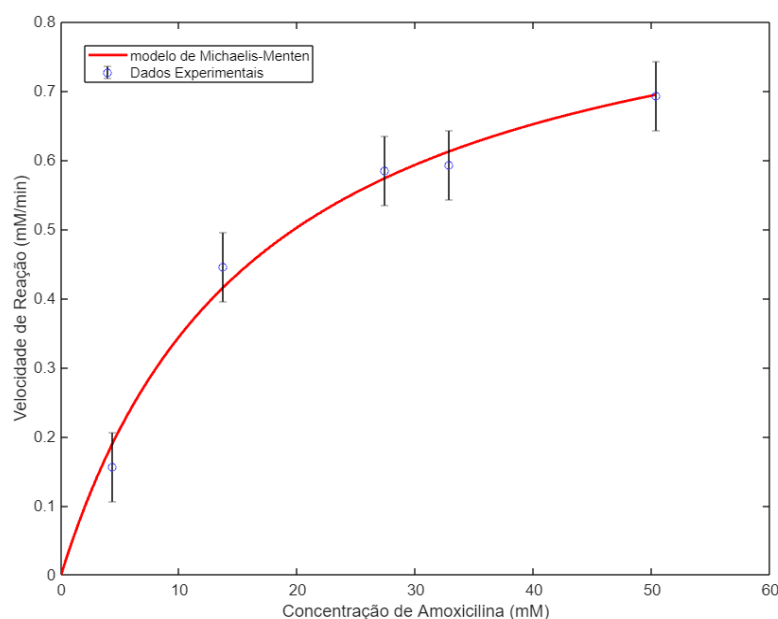
Tabela 7 - Velocidades iniciais de hidrólise de amoxicilina catalisada por PGA, para diferentes concentrações iniciais do substrato.

$C_{\text{Inicial de amox}}$ (mM)	velocidade inicial $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$
4,3787	0,156
13,6836	0,445
27,3672	0,585
32,8407	0,593
50,3557	0,693

Fonte: Autor, 2023.

Considerando que a cinética da maioria das reações enzimáticas é geralmente bem representada pelo modelo de Michaelis-Menten, procedeu-se o ajuste desse modelo aos dados experimentais utilizando o *software* MATLAB. O objetivo desse ajuste foi obter estimativas dos parâmetros cinéticos do modelo, conforme ilustrado na Fig. (18) e resumido na Tab. (7).

Figura 18 - Análise da Cinética de Michaelis-Menten a 38 °C e pH 7,0 com diferentes concentrações de amoxicilina.



Fonte: Autor, 2023.

Pode-se observar que a velocidade máxima ocorreu com o valor de 0,92 mM/min e a afinidade da enzima para a reação de hidrólise do antibiótico é de 16,89 mM, indicando que nas faixas de concentração inicial de amoxicilina estudada a hidrólise será favorecida.

Tabela 8- Parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste dos pontos experimentais da reação de hidrólise da amoxicilina catalisada por PGA ao modelo de Michaelis-Menten.

Parâmetro cinético	Valor	erro
$V_{\max}$ (mM. min ⁻¹)	0,9272	(± 0,2367)
K_m (mM)	16,8972	(± 11,4736)
R^2	0,9137	

Fonte: Autor, 2023.

Os valores encontrados neste trabalho estão conforme àqueles encontrados na literatura, tal qual o reportado por Norouzian (2002), que ao avaliar a hidrólise da Penicilina

G de *E. coli* PPA 78 imobilizada, obteve o valor de 27,34 mM para K_m .

5. CONCLUSÕES

Contudo, a concentração inicial de substrato foi a variável que mais influenciou a hidrólise da amoxicilina, seguida da temperatura e pH quadráticos.

A hidrólise do antibiótico aumentou linearmente com o aumento da sua concentração inicial. Ademais, a máxima atividade da PGA foi observada em valores intermediários de temperatura e pH, 38 °C e 7,0 respectivamente. Logo, pode-se considerar a PGA um potencial catalisador para a hidrólise da amoxicilina presente em corpos d'água, devido ao seu bom desempenho nas condições aproximadas de pH e temperatura que eles apresentam.

Por fim, o modelo de Michaelis-Menten representou bem a cinética da reação, cujos valores dos parâmetros obtidos indicaram uma boa afinidade da PGA pela amoxicilina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, Camila Janaina Manguiera de; SIQUEIRA, Vanessa Felix de Almeida; SOUZA, Flávio Junior Manguiera de; SILVA, Jessica Laís das Neves; SANTOS, Kelly Ferreira dos; CIPRIANO, Daniela Zacarias; DIAS, Leoní Adriana de Souza; FARO, Flavio R. A. Revisão Bibliográfica de Antibióticos Beta-lactâmicos. *Revista Saúde em Foco*, 11, 2019.

AZEVEDO, Sílvia Marisa Moreira. *Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2014.

BHAGAT, C., KUMAR, M., TYAGI, V.K. *et al.* Proclivities for prevalence and treatment of antibiotics in the ambient water: a review. *npj Clean Water* 3, 42 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41545-020-00087-x>

BALASINGHAM, K.; WARBURTON, D.; DUNNIL, P.; LILLY, D. The Isolation and Kinetics of Penicillin Amidase from *Escherichia Coli*. *Biochimica ET Biophysica acta*, p. 250-256, 1972.

BARCELONA, Laura; MARIN, Marcelo; STAMBOULIAN, Daniel. Betalactâmicos con inhibidores de betalactamasas: Amoxicilina-sulbactam. *Medicina (B. Aires), Ciudad Autónoma de Buenos Aires*, v. 68, n. 1, p. 65-74, feb. 2008. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802008000100012&lng=es&nrm=iso. accedido en 09 set. 2023.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, ago. 2003.

CALIXTO, Carolina Maria Fioramonti e CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. *Química Nova na Escola*, n. 3, p. 118-123, 2012. Acesso em: 08 set. 2023.

CARLINI, Célia R. *Biofísica de Proteínas*. 05 nov. 2014. Apresentação do Powerpoint. Disponível em: https://pt.slideshare.net/alinelua_kiss/caractersticas-gerais-enzimtica

CHEN, M.; MOU, X.; WANG, S.; CHEN, X.; TAN, Y.; CHEN, M.; ZHAO, Z.; HUANG, C.; YANG, W.; LIN, R.; et al. Porous Organic Polymer-Supported Palladium Catalyst for Hydroesterification of Olefins. *Mol. Catal.* 2020, 498, 111239.

CUNHA, Josiane Patrícia Nogueira da. Avanços na terapia antimicrobiana em infecções causadas pela espécie *Acinetobacter baumannii*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Departamento de Microbiologia, 2019.

DANILOV, Tatiana. Utilização de Antibióticos Beta-lactâmicos na Terapêutica da Tuberculose Multirresistente. Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 2020.

FERREIRA, Ricardo Boavida. "Cinética enzimática". Aula nº 12, BIOQUÍMICA, Licenciatura em Biologia, Ano Letivo de 2013/2014, ministrada em 28 de março de 2013 no Laboratório 46.

FIGUEIREDO N.G.; ULTRAMARI M. A.; ERNANI P. Estudo da degradação da amoxicilina e caracterização de seus produtos de degradação por HPLC-UV-ESI-MS para determinação em amostras de água. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2020.

FONSECA DA SILVA, Valdemir; WOLFF, Delmira Beatriz; CARISSIMI, Elvis. Contaminação de efluentes por amoxicilina: consequências ambientais e métodos de remoção. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2021.

GAFFNEY, V. D. J., CARDOSO, V. V., RODRIGUES, A., FERREIRA, E., BENOLIEL, M. J., & ALMEIDA, C. M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova* 2004, 37, 138-149.

GROSS, Rogério. Hidrólise enzimática de gorduras de origem natural. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

GUAJARDO, N.; AHUMADA, K.; de María, P.D. Immobilization of *Pseudomonas Stutzeri*

Lipase through Cross-Linking Aggregates (CLEA) for Reactions in Deep Eutectic Solvents. *J. Biotechnol.* 2021, 337, 18–23.

HONG, J.; JUNG, D.; PARK, S.; OH, Y.; OH, K.K.; LEE, S.H. Immobilization of Laccase via Cross-Linked Enzyme Aggregates Prepared Using Genipin as a Natural Cross-Linker. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 169, 541–550.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 4212-4222, 2010.

JIA, J.; ZHANG, W.; YANG, Z.; YANG, X.; WANG, N.; YU, X. Novel Magnetic Cross-Linked Cellulase Aggregates with a Potential Application in Lignocellulosic Biomass Bioconversion. *Molecules* 2017, 22, 269.

LECTURIO, A Biblioteca de Conceitos Médicos, 2022. Disponível em: <https://www.lecturio.com/pt/concepts/cinetica-enzimatica/>. Acesso em: out. 2023.

LIMA, Urgel de A. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. Editora Blucher, 2001. E-book. ISBN 9788521215196. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521215196/>. Acesso em: 10 set. 2023.

LOU, W.-Y.Y.; FERNÁNDEZ-LUCAS, J.; GE, J.; WU, C. Editorial: Enzyme or Whole Cell Immobilization for Efficient Biocatalysis: Focusing on Novel Supporting Platforms and Immobilization Techniques. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9, 620292.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilia surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 60, p. 385-393, 2011.

MIGUEL, Gabriela Coelho; ORLANDO, Eduardo Adilson; SIMIONATO, Ana Valéria Colnaghi. Quantificação de Antibióticos Beta-lactâmicos em Medicamentos Veterinários: Determinação de Amoxicilina e Ampicilina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Química Nova, vol. 36, no. 8, p. 1214-1221, 2013.

MORRETTO, A.C.; RAPOSO, L.C.; SILVA, K.G.M.; CAVALCANTE, B. K.; GONZALEZ, A. R.; FERREIRA, M.A.G. PEREIRA, G.J.V. Descarte de medicamentos: como a falta de conhecimento da população pode afetar o meio ambiente. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, v. 3, n. 3, 2020.

NETO, Francisco Simão et al. Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis. *Polymers*, 2023, vol. 15, p. 2057. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15092057>.

NOROUZIAN, Dariush; JAVADPOUR, Sedigheh; MOAZAMI, Nasrin; AKBARZADEH, Azim. Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 30, Jan. 2002,

OLIVEIRA, Daiana Kaminski de. Identificação Espectroscópica no Ultravioleta de Amoxicilina em Meio Aquoso: Uma Experimentação Contextualizada para o Ensino de Química na Graduação. Bagé, 2017.

OLIVEIRA C.M.R., CARDOSO K.M., SOUZA M.M., SANTOS J.S., SANTOS M.L.P. Validação de um método prático para determinação de níveis de amoxicilina em águas naturais por CLAE-UV e sua aplicação na qualidade ambiental. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2015.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti; SPECIAN, Vânia; FELBER, Aretusa Cristina; PAMPHILE, João Alencar. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v. 7, n. 3, p. 97-109, set.-dez. 2012.

PIRES, M. A. F. Desenvolvimento e validação da metodologia SPE-LC-MS/MS para a determinação de fármacos e drogas de abuso nas águas da represa Guarapiranga-São Paulo/SP 2015.

RALBOVSKY, N., & SMITH, J. (2021). Machine Learning and Chemical Imaging to Elucidate Enzyme Immobilization for Biocatalysis.. *Analytical chemistry*.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01909>.

REIS, C.E. Estudo da Eficácia da Amoxicilina Incorporadas em membranas de látex. [Trabalho de Conclusão de Curso], Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis. 2015.

RODRIGUES, R.C.; VIRGEN-ORTÍZ, J.J.; DOS SANTOS, J.C.S.; BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, A.R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZLAFUENTE, R. Immobilization of Lipases on Hydrophobic Supports: Immobilization Mechanism, Advantages, Problems, and Solutions. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 746–770.

SANTOS, Sharline Florentino de Melo et al. Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta no Estudo da Produção de Pectinase por Fermentação em Estado Sólido do Pedúnculo de Caju. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 10, n. 2, p. 101-109, 2008.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

SHELDON, R.A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Org. Process Res. Dev.* 2011, 15, 213–223.

SHIHOMATSU, H. M. Desenvolvimento e validação da metodologia SPE-LC-MS/MS para a determinação de fármacos e drogas de abuso nas águas da represa Guarapiranga - São Paulo/SP, Brasil. 2015. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SILVA, Giovanilton F.; CAMARGO, Fernando L.; FERREIRA, Andrea L.O. Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. *Fuel Processing Technology*, Elsevier, v. 92, p. 407-413, março de 2011.

SILVA, Valdemir Fonseca da; WOLFF, Delmira Beatriz; CARISSIMI, Elvis. Contaminação

de efluentes por amoxicilina: consequências ambientais e métodos de remoção. *Brazilian Journal of Science*, v. 1, n. 2, p. 8-20, 2021.

SIRISHA, V. L., JAIN, Ankita., & JAIN, Amita. (2016). Enzyme Immobilization. *Advances in Food and Nutrition Research*, 179–211. doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004.

TEKLU, D.S.; NEGERI, A.A.; LEGESE, M.H.; BEDADA, T.L.; WOLDEMARIAM, H.K.; TULLU, K.D. Extended-spectrum beta-lactamase production and multi-drug resistance among Enterobacteriaceae isolated in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v.8, n.1, p.1–12, 2019.

WAHAB, M.K.H.A.; EL-ENSHASY, H.A.; BAKAR, F.D.A.; MURAD, A.M.A.; JAHIM, J.M.; ILLIAS, R.M. Improvement of Cross-Linking and Stability on Cross-Linked Enzyme Aggregate (CLEA)-Xylanase by Protein Surface Engineering. *Process Biochem.* 2019, 86, 40–49.

WEI Wang, LE Deng, ZHI Hui Peng, XIAO Xiao, Study of the epoxydized magnetic hydroxyl particles as a carrier for immobilizing penicillin G acylase, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 40, Issue 2, Pages 255-261, 2007.

YANG, Y., LIU, F., LI, W., WU, W., LONG, X., & GUO, J. Occurrence and ecological risk assessment of amoxicillin in surface water of the Yellow River Basin, China. *Environmental Pollution*, 249, 23-31. 2019. doi:10.1016/j.envpol.2019.03.058.