

INATIVAÇÃO POR HIDRÓLISE ALCALINA DE ANTIBIÓTICOS- LACTÂMICOS, CEFALOSPORÍNICOS E PENICILÂMICOS

Joel Rocha Silva - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Daiana da Silva Vargem - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Wilians dos Santos - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Graziela Ferreira Frutuoso - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Eliane de Fátima Vieira - Faculdade Anhanguera de Anápolis

Eliana Divina de Menezes - Faculdade Anhanguera de Anápolis

RESUMO: As indústrias farmacêuticas que produzem antibióticos β -lactâmicos necessitam de métodos para inativação dos resíduos gerados durante o processo produtivo. Resíduos de processo, sobras analíticas são potenciais contaminantes, mesmo quando são lançados diretamente as estações de tratamento de esgoto industrial. Considerando que o processo de tratamento de esgoto convencional utiliza o lodo ativado, ou seja, processo pelo qual a degradação de matéria orgânica é feita por meio de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, o desprezo residual com presença de antibióticos cuja função é inibir o crescimento bacteriano ou matar bactérias causará um desequilíbrio na microbiota funcional das estações de tratamento de esgoto industrial. Uma maneira de inibir a ação destas moléculas no meio ambiente é a sua inativação, que facilmente é viabilizada por hidrólise em meio alcalino, sendo comprovada por testes cromatográficos e microbiológicos. Dentro desta proposta a inativação por hidrólise alcalina de antibióticos β -Lactâmicos (cefalosporínicos e penicilâmicos) é viável e eficaz.

ABSTRACT: The pharmaceuticals industries that work with the production of antibiotics β -lactam needs some methods to inactivate the residues produced inside all the productive chain. Process residues, analytical leftovers, should be considered as a big capacity contamination product even when launched directly in the industry sewer treatment station. Considering that the conventional sewer treatment process use the activated slim, in other words, by which process degradation of organic matter is done throughout aerobics and anaerobic microorganisms, the residual contempt in the antibiotics presence whose function is to inhibit the bacterial growth or kill the bacteria will promote a imbalance in the functional microbial from the industry sewer treatment stations. Within this proposed the inactivation by alkaline hydrolysis of antibiotics β -lactam (cephalosporin and penicillin) is viable and effective, and proved throughout chromatographic and microbiological tests.

PALAVRAS-CHAVE:

inativação; hidrólise; antibióticos; β -lactâmicos; resíduos.

KEYWORDS:

inactivation; hydrolysis; antibiotics; β -Lactam; residues.

Artigo Original

Recebido em: 10/02/2013

Avaliado em: 01/04/2013

Publicado em: 09/06/2014

Publicação

Anhanguera Educacional Ltda.

Coordenação

Instituto de Pesquisas Aplicadas e

Desenvolvimento Educacional - IPADE

Correspondência

Sistema Anhanguera de

Revistas Eletrônicas - SARE

rc.ipade@anhanguera.com

1. INTRODUÇÃO

Em 1928, Alexander Fleming, que trabalhava no Hospital St. Mary, em Londres, observou que uma placa de cultura na qual estavam crescendo estafilococos havia sido contaminada por um fungo do gênero *Penicillium* e que, na vizinhança do fungo, o crescimento bacteriano havia sido inibido. Fleming isolou o fungo em cultura pura e demonstrou que ele produzia uma substância antibacteriana, que denominou penicilina. Florey e Chain e colaboradores em Oxford, em 1940 demonstraram que a penicilina apresentava poderosas propriedades quimioterápicas em camundongos infectados, além de ser atóxica. Seus notáveis efeitos antibacterianos nos seres humanos foram claramente demonstrados em 1941 (PEREIRA; PITA, 2005).

As penicilinas são antibióticos extremamente eficazes, sendo amplamente utilizados e que possuem a seguinte estrutura química geral mostrada na (figura 1). Os antibióticos possuem a seguinte classificação: Antibióticos β-Lactâmicos (Clássicos e Não Clássicos); Cefalosporinas; Cloranfenicol; Tetraciclina; Polipeptídicos; Aminociclitolis Aminoglicosídeos e Macrolídeos (RANG, DALE e RITTER 1997).

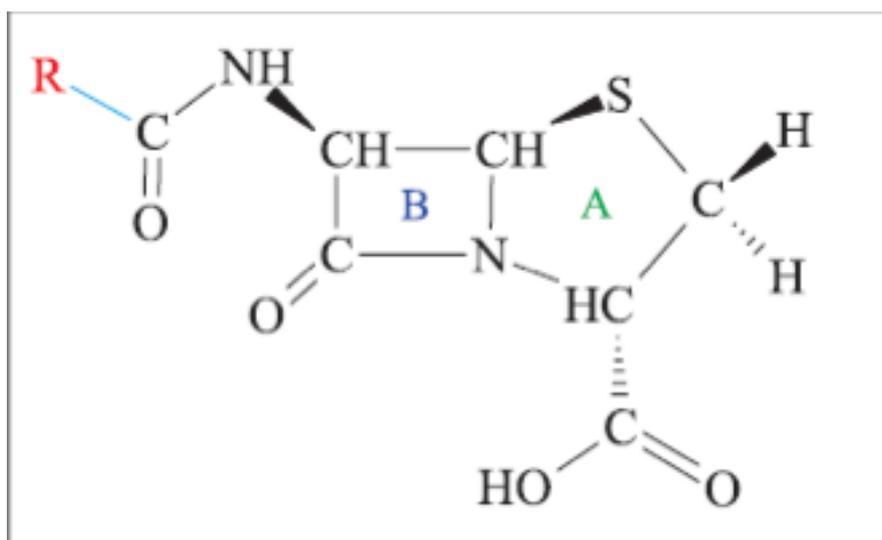


Figura 1. Forma estrutural geral da penicilina.

Fonte: CALIXTO; CAVALHEIRO, 2012.

Uma das grandes preocupações ambientais está na presença de produtos farmacêuticos em estações de tratamento de esgoto e posteriormente nos rios e mananciais, produtos farmacêuticos estes que em sua maioria tem grande persistência química, resistência microbiana, e muitas vezes efeitos sinérgicos, que levam às implicações toxicológicas. Apesar das baixas concentrações presentes nos efluentes o lançamento destes produtos sem tratamento pode provocar efeitos adversos na vida aquática, causando danos tanto à saúde humana quanto à ecologia aquática (ONESIOS, YU e BOUWER, 2009).

Algumas toneladas de medicamentos são produzidas anualmente com aplicação humana ou veterinária, a quantidade exata destes fármacos não é conhecida em literatura,

porém estima-se que boa parte destes produtos são voltados às infecções bacterianas, dentre estes fármacos destaca-se os β -lactâmicos (cefalosporínicos e penicilâmicos) de origem sintéticas ou semissintéticas (BILA; DEZOTTI, 2003).

A presença de compostos farmacêuticos e de higiene pessoal no ambiente aquático tem sido objeto de preocupação entre a comunidade científica. Uma forma de aporte dessas substâncias ocorre por meio dos efluentes das indústrias farmacêuticas que possuem baixa biodegradabilidade e alta toxicidade. A preocupação com relação aos efluentes da produção industrial dos antibióticos β -lactâmicos se deve ao fato de que, os mesmos podem promover efeitos negativos como o desenvolvimento de organismos resistentes no ambiente aquático (LONGHIN, 2008).

O tratamento de compostos residuais nos efluentes gerados pela indústria farmacêutica é complexo e depende dos processos de produção. Efluentes com altas frações de carbono são facilmente biodegradáveis como os solventes e excipientes, maiores problemas são gerados por quantidades baixas de compostos orgânicos recalcitrantes (princípios ativos dos fármacos), estes levam a um acúmulo de compostos orgânicos não biodegradáveis no ambiente (COELHO, 2008).

O lançamento de efluente contendo antibióticos, em geral, pode levar ao desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes, alterando a estrutura da comunidade microbiana na natureza e, afetando as bactérias suscetíveis. A maior rota de exposição, tanto para os humanos como para animais é na ingestão de fármacos através dos alimentos ou água, o que pode levar a bioacumulação e biomagnificação, fármacos não precisam ser liberados de forma contínua no meio ambiente uma vez que, esta liberação é de maneira contínua tanto pela sua utilização como também por processos produtivos que não venham se atentar a essa problemática (SANDERSON; THOMSEN, 2009).

Os antibióticos β -lactâmicos compõem uma importante classe de fármacos voltados a tratamento de infecções bacterianas, da mesma forma com grande possibilidade de gerar impacto ambiental devido a sua atividade biológica específica. No Brasil, a indústria farmacêutica não sintetiza estes fármacos, apenas manipula suas formulações a partir de matéria-prima importada, este processo gera uma carga de resíduos moderada variando conforme sazonalidade de sua produção. Os efluentes gerados por este processo possuem baixa biodegradabilidade, pois seus componentes são altamente ativos e tóxicos, promovendo a inibição da atividade de sistema de tratamento de efluentes com lodo ativado causando problemas aos corpos receptores (COELHO, 2008).

Os microrganismos, especificamente as bactérias, produzem uma enzima chamada de β -lactamase que favorece a sobrevivência de outros microrganismos sensíveis aos antibióticos em um processo infeccioso. Observa-se que a hidrólise do anel β -lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas, forma o ácido penicilóico que fica sematividade

antimicrobiana, ocorrendo o mesmo com as cefalosporinas e carbapênicos (TAVARES, 2001).

Algumas estratégias vêm sendo utilizadas pelas indústrias farmacêuticas que buscam desenvolver novos produtos com maior eficácia terapêutica, dentre estas inovações destacam-se as modificações enzimáticas e de estruturas nos antibióticos, técnica empregadas para vencer a resistência dos β -lactâmicos à β -lactamase (MOOSDEEN, 1996).

Resíduos de processo, sobras analíticas devem ser considerados como um produto de grande capacidade de contaminação mesmo quando são lançadas diretamente nas estações de tratamento de esgoto industrial. Considerando que, o processo de tratamento de esgoto convencional utiliza-se o lodo ativado, ou seja, processo de degradação de matéria orgânica por meio de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, o despejo de resíduos com presença de antibióticos cuja função é inibir o crescimento bacteriano ou matar bactérias causará um desequilíbrio na microbiota funcional das estações de tratamento de esgoto industrial (BRASIL, 2011).

Na cidade de Anápolis, no Estado de Goiás, a Goiás Industrial, órgão do Governo Estadual que regula as atividades industriais no Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA) estabelece em regulamentos diversos parâmetros para lançamentos de efluentes na rede captadora, dentre esses parâmetros a presença de antibióticos deve ser inibida, e com a devida comprovação de que o processo de inativação destas substâncias seja eficaz (BRASIL, 2011).

Na presente pesquisa visou-se estabelecer critérios comprobatórios de que a inativação por hidrólise alcalina de antibióticos β -lactâmicos (cefalosporínicos e penicilâmicos) é viável e eficaz, através de testes cromatográficos e microbiológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos dados analíticos foram divididas em duas etapas, sendo a primeira com o objetivo de quantificar o tempo de exposição necessário de uma solução contendo moléculas de β -lactâmicos em solução aquosa sobre influência de pH alcalino, em paralelo a quantificação destas moléculas através de cromatografia líquida, com metodologias específicas para cada substância em pesquisa.

Como parâmetro de avaliação e validação da técnica de inativação por hidrólise alcalina o teste utilizou em estudo moléculas clássicas empregadas na terapêutica com grupos de antibacterianos β -lactâmicos, para isso foi escolhido às seguintes moléculas: Penicilâmicos (Amoxicilina, Ampicilina sódica, Amoxicilina + clavulanato de potássio e Piperacilina sódica + Tazobactam sódico); Cefalosporínicos (Cefalotina sódica, Cefuroxima sódica, Ceftriaxona Sódica, Cloridrato de cefepima).

Para cada molécula escolhida foi preparada uma solução contendo 1mg/mL de substância ativa em solução aquosa e, acrescentado uma solução de hidróxido de sódio

5M para elevação do pH até o ponto da hidrólise do anel β -lactâmico, pH entre 12 e 14, através de metodologias compendiadas para cada analito e se fez a determinação do tempo necessário de exposição da solução contendo antibiótico a um pH alcalino, como referência uma solução de padrão primário da Farmacopeia Brasileira ou USP- Farmacopeia Americana na mesma concentração da solução teste.

Após a alcalinização da solução teste, a mesma permaneceu sob agitação constante para manter a homogeneidade do meio e simular a possibilidade de aplicação da técnica em Estações de Tratamento de Efluentes (ETE's), sendo coletadas amostras em intervalos de tempos pré-determinados e analisadas frente à solução padrão, até que se teve uma hidrólise completa da molécula.

Na técnica de quantificação por cromatografia líquida foi empregado cromatógrafo da marca Agilent modelo 1200, solventes, sais, colunas de separação, conforme monografia disponível em compêndios oficiais e na sua ausência metodologias validadas, sendo todos materiais e consumíveis necessários fornecidos pela empresa parceira do projeto.

A devida comprovação da ineficácia da molécula de β -lactâmico após sofrer hidrólise alcalina se fez pela cultura de microrganismos na presença de antibióticos que não sofreram inativação em comparação às mesmas moléculas após hidrólise.

Após determinar o tempo necessário para hidrolisar por completo a molécula teste, em uma placa de Petri, foi colocado 1mL da solução hidrolisada com concentração de 1mg/mL de substância ativa hidrolisada e infundido na mesma placa meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA), posteriormente inoculado por Pour Plate cepas padronizadas de microrganismos.

Para cada molécula de antibiótico hidrolisado foram preparadas quatro placas com 1mL da solução e completada com meio Tryptic Soy Ágar (TSA), e em cada uma delas Pour Plate semeado um dos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Bacillus subtilis spizizenii* (*B. subtilis spizizenii*).

Como controle e parâmetro de avaliação foram também preparadas quatro placas com 1mL de solução de cada um dos antibióticos na concentração de 1mg/mL de substância ativa, sem que o mesmo tenha passado pelo processo de hidrólise.

A determinação da inativação das moléculas pela hidrólise alcalina foi realizada pelo método de contagem microbiana - Pour Plate que consiste na incubação direta dos microrganismos e das substâncias testes em meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA).

O primeiro teste verificou-se a viabilidade dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* - ATCC 8739 (bacillus Gram-negativo); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC - 9027 (bacillus Gram. negativo); *Bacillus subtilis spizizenii* ATCC - 6633 (bacillus Gram-positivo) e *Staphylococcus aureus* ATCC - 6538 (cocos Gram-positivo).

Foi transferido em duplicata 1 ml de suspensão do microrganismo, com concentração conhecida para placas de Petri estéreis, em seguida foi adicionado aproximadamente 20 mL de meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA) fundido e mantido a 45°C, com subsequente homogeneização por meio de movimentos circulares. Após solidificação as placas foram incubadas a 32,5°C por 48 horas.

Em sequência foram feitos individualmente com todos os microrganismos propostos no presente estudo um segundo teste - (Inoculação com fármaco inativo), foram transferidos para as placas de Petri 1 ml do fármaco inativo e 1 ml de suspensão microbiana, em seguida adicionou-se aproximadamente 20 mL de meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA) fundido e mantido a 45°C, com homogeneização por meio de movimentos circulares. Após solidificação as placas foram incubadas a 32,5°C por 48 horas.

A mesma técnica foi utilizada para o terceiro teste - (Inoculação com fármaco ativo) sendo transferido para as placas de Petri 1 mL de fármaco ativo e 1 mL de suspensão microbiana. Além disso, foram realizados os controles negativo do teste sendo adicionadas as placas de Petri somente 20 mL de meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA).

Decorrido o término da incubação foram realizadas leituras das placas com auxílio de um contador de colônias. Os resultados de viabilidade do microrganismo (controle positivo do teste) foram comparados aos demais.

Todas as placas foram incubadas a uma temperatura controlada e ideal para o crescimento de bactérias que conforme literatura que é de 32°C \pm 1°C.

3. RESULTADOS

A hidrólise alcalina tem a capacidade de quebrar o anel β -lactâmico, desta forma mudando a estrutura molecular da substância. Em cromatografia líquida a mudança na estrutura molecular infere em uma mudança na afinidade da substância pela fase estacionária e fase móvel, desta forma o sinal gerado pelo fármaco será perdido ou terá seu tempo de retenção alterado, o que irá comprovar a eficácia total ou parcial da hidrólise alcalina proposta, a partir da utilização de hidróxido de sódio como agente alcalinizante.

De forma parecida, a hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos inibe sua capacidade antibacteriana, com a comparação da capacidade inibitória de crescimento bacteriano entre substância hidrolisada e a substância não hidrolisada, foi possível evidenciar que a técnica é eficaz e passível de utilização em Estações de Tratamento de Efluentes (ETE's), com intuito de minimizar os danos ambientais gerados pelo desprezo de substâncias com capacidade de gerar microrganismos resistentes.

Considera-se uma solução alcalina, toda solução com pH acima de 7,0, para obter-se uma hidrólise satisfatória das moléculas testadas, as mesmas tiveram seu pH em meio aquoso em concentração de 1,0mg/mL de substância ativa elevada acima do pH 12. A tabela

1 mostra o pH inicial e o pH final das soluções.

Tabela 1. pH inicial e final da solução de antibióticos testados.

pH de Inativação			
	Molécula	pH Inicial	pH Final
1	Amoxicilina	5,50	12,03
2	Ampicilina	5,40	12,51
3	Amoxicilina + Clavulonato	4,90	12,44
4	Cefalotina	7,65	12,11
5	Ceftriaxona	4,80	12,33
6	Cefuroxima	4,30	12,45
7	Cefepima	4,80	12,51
8	Piperacilina + Tazobactam	5,80	12,17

A quantificação da concentração de uma molécula por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se detector Ultra-Violeta (UV) em comprimentos de ondas ideais é calculada, tomando como base o sinal emitido pela passagem das moléculas pelo detector, o qual intensifica de maneira proporcional a concentração, gerando então um sinal analógico denominado pico, a área deste pico do padrão comparada com a área do pico de uma solução de concentração desconhecida preparada nas mesmas condições, estabelece o resultado da concentração da substância analisada.

As análises das amostras diluídas na concentração de 1,0mg/mL utilizando-se metodologias descritas na Farmacopeia Americana 2012 (USP 35), demonstram a hidrólise praticamente total em pH alcalino das moléculas testadas conforme tabela 2, com um tempo de 2 horas nas condições de pH alcalino e sob agitação constante, observa-se um declínio acentuado na concentração do analito na solução.

Tabela 2. Concentração ativa dos antibióticos em relação ao tempo de exposição ao pH alcalino.

Concentração em relação ao tempo						
	Molécula	(%) tempo zero	(%) 10 minutos	(%) 30 minutos	(%) 60 minutos	(%) 120 minutos
1	Amoxicilina	100,0	35,07	16,50	7,77	0,11
2	Ampicilina	100,0	42,15	7,25	2,14	0,18
3	Amoxicilina + Clavulonato	100,0	11,20			
				2,80	1,80	0,06
4	Cefalotina	100,0	3,40	0,37	0,00	0,00
5	Ceftriaxona	100,0	9,40	3,50	2,40	0,02
6	Cefuroxima	100,0	8,50	2,80	2,50	0,08
7	Cefepima	100,0	11,20	3,10	2,50	0,04
8	Piperacilina+ Tazobactam	100,0	10,50			
				2,50	1,00	0,10

A partir de cepas mãe foram realizados repiques para preparações das diluições, para cada microrganismo foram preparados suspensões de 10^{-1} , 10^{-2} e sucessivamente até 10^{-10} , sendo que para ser incubado junto aos ativos testados foi utilizado uma diluição de 10^{-6}

onde a contagem em placa após período de incubação da cepa em meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA) obteve contagem não maior que 120UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por placa em média nas replicatas em um período de incubação sob temperatura controlada de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A tabela 3 mostra a média das contagens em placa para o repique utilizado.

Tabela 3. Viabilidade de Microrganismos na suspensão de 10^{-6} .

Viabilidade do Microrganismo			
B. subtilis speizenii	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa
6633	6538	8739	9027
24 UFC/mL	62 UFC/mL	106 UFC/mL	08 UFC/mL

A tabela 4 mostra o número de colônias em média nas placas inoculadas com as cepas testadas juntamente com as moléculas inativadas por hidrólise em meio alcalino, observa-se que o crescimento bacteriano não foi impedido pela presença de nenhum dos antibióticos testados. Foi incubado por um período de 48 horas quando se realizou a contagem com auxílio de contador de colônias.

Tabela 4. Crescimento dos microrganismos na presença de fármacos inativos.

FÁRMACO INATIVO	Crescimento Microbiano UFC/mL			
	B. subtilis speizenii	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa
Amoxicilina	10	56	122	04
Ampicilina	19	70	124	05
Amoxicilina + Clavulanato	19	58	94	06
Cefalotina	18	70	96	10
Ceftriaxona	06	76	101	06
Cefuroxima	18	52	99	03
Cefepima	17	59	106	04
Piperacilina + Tazobactam	18	71	115	07

Considera-se satisfatório o crescimento bacteriano de cepas padronizadas de microrganismos quando este obtém no mínimo 70% em relação ao número de colônias obtidas na diluição utilizada conforme resultados encontrados na viabilidade desta diluição. A tabela 5 mostra a não viabilidade no crescimento bacteriano quando inoculado com a presença de antibióticos na sua forma ativa, ou seja, que não passaram pelo processo de hidrólise em meio alcalino, observa-se que para todas as moléculas de β -lactâmicos da classe dos cefalosporínicos não houve crescimento (NHC), o que pode ser explicado em função da sua maior especificidade frente às cepas testadas.

Tabela 5. Crescimento dos microrganismos na presença de fármaco ativo.

FÁRMACO ATIVO	Crescimento Microbiano UFC/mL			
	B. subtilis spezizenii	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa
Amoxicilina	<70%	<70%	<70%	<70%
Ampicilina	<70%	<70%	<70%	<70%
Amoxicilina + Clavulanato	<70%	<70%	<70%	<70%
Cefalotina	NHC	NHC	<70%	<70%
Ceftriaxona	NHC	NHC	NHC	NHC
Cefuroxima	NHC	NHC	NHC	NHC
Cefepima	NHC	NHC	NHC	NHC
Piperacilina + Tazobactam	NHC	NHC	NHC	NHC

4. DISCUSSÃO

As moléculas de antibióticos possuem características químicas diversas em suas estruturas, sendo as mesmas produzidas em larga escala e em grande variedade dentro de uma planta fabril. As indústrias farmacêuticas geram efluentes com concentrações residuais dos produtos sintetizados e/ou envazados, juntamente com os solventes utilizados nos processos e seus produtos intermediários, os quais podem apresentar características de não biodegradabilidade, e toxicidade para o meio ambiente (MASCOLO et al., 2010).

Os antibióticos em sua maioria são compostos polares, com estruturas químicas e reações de alta complexidade. Possui em suas estruturas químicas, um grande número de grupos funcionais, como o ácido carboxílico, amida, amina, álcool, cetona, enol, fenol, tiazol, nitro composto, derivados halogenados, sulfonamida entre outros, caracterizando uma grande atividade química e biológica dessas substâncias. Os grupos funcionais propiciam interações por processos de adsorção ou complexação. Os antibióticos β -lactâmicos possuem a estrutura básica formada pelo anel β -lactâmico ligado ao anel tiazolidínico, identificados nas (figuras 2 e 3), esta característica peculiar deste tipo de molécula permitiu o uso da técnica de hidrólise em meio alcalino, que se fundamenta na capacidade do meio em hidrolisar o anel β -lactâmico, mudando a estrutura da molécula e sua polaridade, esta condição permitiu uma quantificação por meio de cromatografia líquida em relação tempo de exposição há uma condição de pH alcalino (CASTIGLIONI et al., 2004).

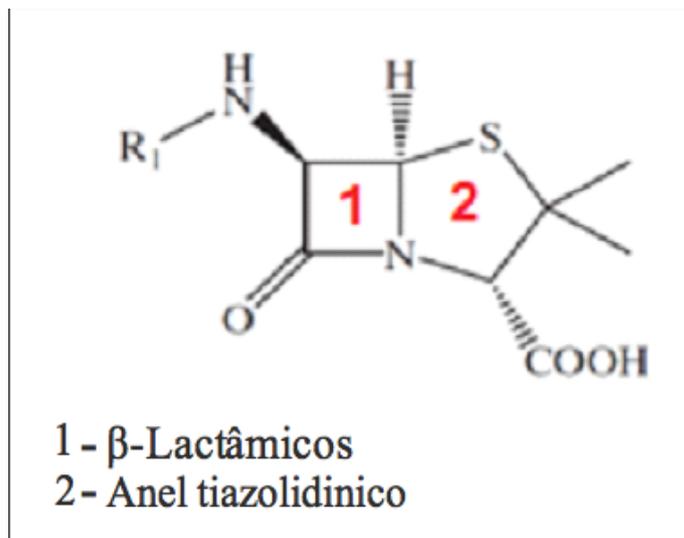


Figura 2. Estrutura geral das penicilinas/ R1 – substituinte dos diferentes antibióticos.

Fonte: VASCONCELOS, 2011.

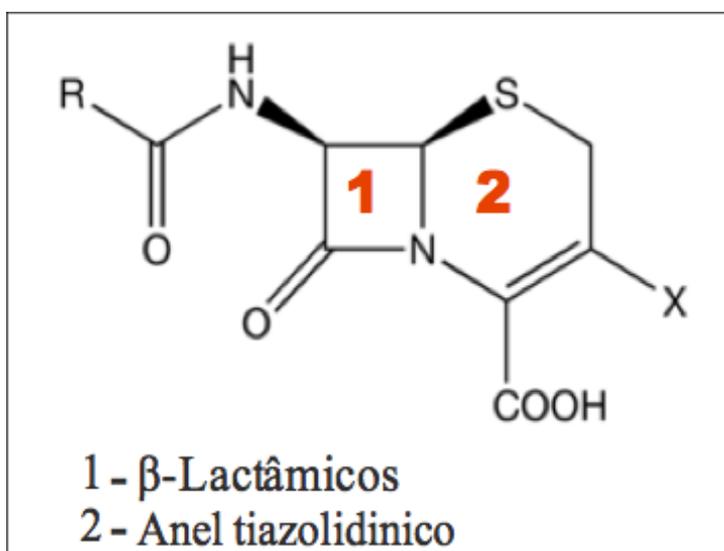


Figura 3. Estrutura geral das Cefalosporinas/ R1 – substituinte dos diferentes antibióticos.

Fonte: FERREIRA, 2007.

Em geral os antibióticos β -lactâmicos na sua estrutura farmacofóricas têm um elemento em comum, o anel azetidínico de quatro membros, ou anel β -lactâmico. Nesta classe de antibióticos, o anel central β -lactâmico é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis (di-hidrothiazínico) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente, este sistema composto por estes dois anéis de forma tensionada contribui para o aumento da instabilidade química do anel β -lactâmico, altamente suscetível ao ataque de nucleófilos que promovem a hidrólise do grupo farmacofóricas. A presença da molécula em meio alcalino promoveu a abertura do anel β -lactâmico, inativando o antibiótico, o que pode ser verificado mediante os resultados obtidos em análises cromatográficas, onde em um período de 2 horas as diversas moléculas testadas em meio alcalino foi verificado que as concentrações de moléculas ativas foram reduzidas quase a zero como mostra a tabela 2, a hidrólise no anel

β -lactâmico como previsto alterou a polaridade das moléculas e, conseqüentemente, sua interação com a fase estacionária conforme o método utilizado, essa diferença na polaridade em relação à molécula original altera o tempo de retenção ou mesmo inibe a interação com a fase estacionária, o que ocasiona total interação com a fase móvel levando a obter um sinal em tempo de retenção totalmente diferente da molécula original (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010) .

A inoculação *Pour Plate* em meio de cultura Tryptic Soy Ágar (TSA) como em quaisquer outros meios de cultura que são nada mais que uma associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural. Com os resultados obtidos utilizando cultura de cepas conhecidas e em concentrações conhecidas pode ser observar que a presença de antibióticos *in-natura* junto ao inóculo impediu significativamente o crescimento bacteriano e em algumas cepas as quais os antibióticos têm sua indicação terapêutica em função do seu espectro de ação impossibilitou totalmente o crescimento bacteriano conforme tabela 5, em contra partida as mesmas moléculas nas mesmas concentrações pós-inativação por hidrólise alcalina quando inoculada junto aos microrganismos testados não impediram o crescimento bacteriano no meio como mostra na tabela 4 (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

5. CONCLUSÃO

A possibilidade de implantar uma técnica para inativação dos resíduos que contém antibióticos β -lactâmicos, que atenda os requisitos estabelecidos e regulamentados por legislações para o lançamento de efluentes industriais em estações de tratamento de efluentes que apresente confiabilidade e baixo custo norteou a pesquisa em relação à inativação por hidrólise alcalina de antibióticos β -lactâmicos.

A hidrólise do anel β -lactâmico presente nos penicilâmicos e cefalosporínicos altera a estrutura molecular diretamente em seu grupo farmacofórico impedido sua ação bactericida ou bacteriológica. Nesta pesquisa os espectros cromatográficos demonstraram que com a hidrólise do anel β -lactâmico a polaridade foi modificada, exibindo com isso pico em tempo de retenção diferente. Deste modo a quantificação de ativo presente foi possível, uma vez que, essa quantidade é diretamente proporcional à área obtida em cada pico, em comparação aos picos de uma solução padrão não hidrolisada, da mesma forma com o estudo foi possível evidenciar a não efetividade das moléculas hidrolisadas frente aos microrganismos testados, sendo que não impediu o crescimento bacteriano em nenhuma das cepas inoculadas, enquanto que, a inoculação de cepas junto às moléculas potencialmente ativas, estas se colocaram como inibidor parcial ou total do crescimento bacteriano.

Como demonstrado, a hidrólise em meio alcalino é eficiente, apresentando reprodutibilidade em todas as moléculas testadas. Conforme os resultados obtidos o que

respalda a implantação de um sistema que promova a hidrólise por meio alcalino de antibióticos β -lactâmicos, atendendo às necessidades das indústrias que geram efluentes com a presença destas moléculas potencialmente prejudiciais ao meio ambiente. A comprovação evidenciada no estudo demonstra não somente a sua viabilidade no processo, mas também a possibilidade de sua validação e legalização como processo eficaz junto às agências reguladoras.

REFERÊNCIAS

- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*. v. 26, n. 4, p.523 – 530, 2003.
- BRASIL, Regulamento para lançamento de águas na rede coletora de esgoto das companhias de distritos industriais de Goiás – Goiásindustrial -2011
- CALIXTO, C.M.F.; CAVALHEIRO E. T. G., Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. *Revista Química Nova na Escola*. v.34, n.3, p.118-123, AGOSTO 2012.
- CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; CALAMARI, D., BAGNATI, R., Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 39, p. 25-32, 2004.
- COELHO, A.D., Degradação dos antiinflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização. (Doutorado no Programa de Engenharia Química - COPPE). – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 69 p., 2008.
- FERREIRA, B.L.A. Identificação da Atividade Antibiótica e Relação Estrutura-Atividade de Moléculas de Origem Sintética e Animal, Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) Programa de Neuroimunologia– Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectiva para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos agentes. *Química Nova*. v.33, n. 3, p.667 – 679, 2010.
- LONGHIN, S. R.. Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos. 2008. 154 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- MASCOLO, G.; BALEST, L.; CASSANO, D.; LAERA, G.; LOPEZ, A.; POLLICE, A.; SALERMO, C., Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. *Bioresource Technology*, v. 101, p 2585-2591, 2010.
- MOOSDEEN, F. Impact of β -lactamases on the clinical use of β -lactam antibiotics. In *Viewpoints in Medicine, Countering Resistance due to β -lactamases*. Worthing: Cambridge Medical Publications, p. 6-11, 1996.
- ONESIOS, K.M.; YU, J.T.; BOUWER, E.J., Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, v. 20, p. 441-466, 2009.
- PEREIRA, A.L.; PITA, J.R. Alexandre Fleming (1881-1955) Da descoberta (1928) ao Prêmio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras HISTÓRIA*. Porto, III Série, v. 6, n. 4, p.129 – 151, 2005.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 3.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- SANDERSON, H.; THOMSEN, M., Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system

for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicology Letters*, v. 187, n. 2, p. 84-93, 2009.

TAVARES, W., Resistência bacteriana. In: *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos* 3. ed. São Paulo: Atheneu, p.79, 2001.

VASCONCELOS, O.M.S.R. Degradação do Antibiótico Amoxicilina em Efluente de Indústria Farmacêutica. 2011. 136f. Dissertação (Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2011.