

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**CAROLINE GUIMARÃES PANÇARDES DA SILVA MARANGONI**

**ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP: UMA CONTRIBUIÇÃO BASEADA NA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE - SERS**

**CURITIBA**

**2022**

**CAROLINE GUIMARÃES PANÇARDES DA SILVA MARANGONI**

**ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP: UMA CONTRIBUIÇÃO BASEADA NA  
ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE - SERS**

**Antimicrobial Stewardship: a contribution based on Surface-Enhanced Raman  
Spectroscopy – SERS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Frieda Saicla Barros.

Coorientador: Prof. Dr. Arandi Ginane Bezerra Jr.

**CURITIBA**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença..



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Curitiba



CAROLINE GUIMARAES PANCARDES DA SILVA MARANGONI

**ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP: UMA CONTRIBUIÇÃO BASEADA NA ESPECTROSCOPIA RAMAN  
AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE - SERS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 24 de Novembro de 2022

Dra. Frieda Saicla Barros, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Luiza Souza Rodrigues, Doutorado - Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe - Ipppp

Dr. Rafael Eleodoro De Goes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/11/2022.

Dedico este trabalho ao meu marido Marcio e aos meus filhos Giovanni e Maria Eduarda por serem minha inspiração, força e alicerce de todos os dias e também aos meus pais Luis Antonio e Ana e minha irmã Christiane por serem meus exemplos e minha diretriz.

## AGRADECIMENTO

Certamente este pequeno texto não será o suficiente para agradecer a todos que me ajudaram incansavelmente nesta jornada. Sem a ajuda de todos este sonho não seria possível.

Primeiramente agradeço ao Pai celeste, a Nossa Senhora e a todos os Santos aos quais roguei ao longo desta caminhada; sem o apoio da fé não teria alicerce para seguir.

À minha família, minha maior gratidão, em especial ao meu marido Marcio, que a todo momento me incentivou, me ajudou com as crianças, foi paciente nas minhas ausências e me escutou em cada vez que eu lia a ele esta dissertação. Enfim, é o meu companheiro para os todos os momentos da vida, “TE AMO”.

Ah, o que dizer dos meus filhos, Giovanni e Maria Eduarda, que são minha vida, minha razão de viver. Em especial ao meu primogênito que é meu maior fã, que estuda comigo e sempre foi muito paciente nos momentos de ausência.

Agradeço ao meu pai Luis Antonio e a minha mãe Ana por serem meu maior exemplo de vida, onde na minha graduação deixaram bem claro que o meu estudo é minha maior herança, pois esta ninguém me tira. Minha Dinda Mônica, que sempre me incentivou e me ajudou muito. Não posso esquecer da chata mais importante da minha vida, minha irmã KIKI, ou melhor a Dr<sup>a</sup> em Educação pela UFRJ Christiane, que é meu maior exemplo de estudo e dedicação na pesquisa.

Agradeço a minha família de Curitiba, minhas comadres Tatiane e Regina, que sem elas, nos momentos difíceis, nada seria possível.

Nesta trajetória, muitas pessoas passaram pelo meu caminho e todas elas foram muito especiais e importantes para este grande momento.

Aos Amigos profissionais da Saúde, em especial os enfermeiros, agradeço pelo incentivo e momentos de entusiasmo que me ajudaram muito a buscarem esta conquista e mostrar que a enfermagem é uma profissão que cuida com conhecimento baseado em evidência.

Hospital da Polícia Militar – agradeço aos meus colegas e chefia do Hospital por me ajudarem nas alterações de horário para conseguir estudar e lograr êxito neste momento. Em especial, agradeço à Ten-Cel QOPM-Bioq. Zeni Vogler por ter me convidado para participar da pesquisa ao qual o hospital foi inserido no ano de 2018

em conjunto com a Fiocruz, Hospital Pequeno Príncipe e UTFPR e também a amiga Microbiologista Elaine Rosa, quem me ajudou e me ensinou muito sobre microbiologia.

Fiocruz- PR – sou eternamente grata por ter tido a oportunidade de aprender com um grupo tão seletivo de profissionais: Maria Luiza, Bárbara, Lais, Nicole, Isabelle e Thábata, todas são parte importante deste momento. Ao querido Dr. Leonardo Foti, ao qual agradeço por todo o ensinamento e confiança que tive neste período sobre sua orientação. Sem a sua iniciativa em pesquisar sobre a resistência antimicrobiana, nada disso seria possível.

Instituto Pelé Pequeno Príncipe – agradeço a todos pelo acolhimento, aprendizado e principalmente a parceria nesta busca incessante de combater a resistência antimicrobiana, em especial a Dr<sup>a</sup> Líbera, Dr<sup>a</sup> Jussara e a Dr<sup>a</sup> Luiza.

UTFPR – ao grupo do PPGEB, agradeço a todos os professores e colegas de turma que me auxiliaram nesta caminhada. À amiga, que descobri em meio às aulas de matemática, Luciana Mattana, obrigada pela parceria e todo o carinho comigo e minha família. Agradeço especialmente aos meus orientadores João Antônio Palma Setti e Frieda Saicla Barros por me acolherem e entenderem a importância desta pesquisa na minha trajetória.

Ao grupo do FOTONANOBIÓ, pois não tenho palavras para expressar minha eterna gratidão a todos aos meus amigos e colegas de grupo: Juliana, Thiago Machado, Tiago Marciniak, Lucas, Rafael Nadas, Raquel e principalmente ao meu querido amigo Vinicius, ao qual deixo aqui registrado que sem a sua ajuda não conseguiria finalizar esta pesquisa... cada gráfico, cada aula de física, cada tarde que passamos juntos pensando em como estruturar nossos estudos, foram primordiais para este momento.

Aos professores Rafael de Góes e Wido Herwig Schreiner agradeço por me acolherem, me desafiarem em cada aula, em cada artigo, em cada apresentação que me incentivaram a fazer, aos quais tinham sempre o objetivo de mostrar o caminho certo da pesquisa e tendo sempre a motivação de aprender mais.

Por fim, deixei este último agradecimento ao professor que mais acreditou que uma simples enfermeira era capaz de realizar um mestrado juntando a área da ciência da saúde com a área da ciência exata. O professor que escutou cada dúvida, cada choro, cada empolgação, que sempre teve a disponibilidade de me atender nos

horários em que eu podia conciliar com o trabalho e com as crianças. Professor Arandi (Arandi Ginane Bezerra Jr), o quão bom seria se o mundo tivesse mais professores como o senhor, que incentiva e segura na mão e vai junto com o aluno. Enquanto professora me espelho no senhor, para que um dia possa ser 1% do profissional que és. A todos, muito obrigada.

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.  
Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me  
mansamente a águas tranquilas.  
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas  
da justiça, por amor do seu nome.  
(SALMO 23:1-3).



## RESUMO

MARANGONI, Caroline Guimarães Pançardes da Silva. **Antimicrobial Stewardship: Uma contribuição baseada na Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície - SERS**. 2022. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2022.

A descoberta da penicilina, em 1928, foi considerada um dos mais importantes avanços da história da medicina, pois somente com a utilização dos antimicrobianos foi possível tratar infecções, antes incuráveis. Contudo, ao longo do tempo, os microrganismos vêm desenvolvendo mecanismos de resistência a estes medicamentos, principalmente devido ao uso indiscriminado. O surgimento de bactérias multirresistentes (BMR), as superbactérias, está sendo considerado um grave problema de saúde pública que, segundo previsões da Organização Mundial da Saúde (OMS), pode levar a 10 milhões de mortes/ano até 2050. O desafio para desenvolver novos antimicrobianos traz consigo a necessidade de verificar a eficácia dos já existentes, bem como uma melhor compreensão acerca dos mecanismos de resistência, daí a importância do desenvolvimento de técnicas rápidas e de baixo custo para o monitoramento da ação dos antibióticos. Neste trabalho apresentamos uma alternativa baseada em nanofotônica que consiste no uso de espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) mediada por diferentes nanopartículas, para a detecção de antimicrobianos, com ênfase em alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos comumente prescritos em casos de pacientes críticos. Os experimentos demonstraram a possibilidade de identificar espectros com vibrações características (fingerprints) desses antimicrobianos, via SERS, com a evidência de que esta tecnologia é um grande contribuinte no programa de Antimicrobial Stewardship, porque possibilita identificar moléculas únicas e também a degradação do antibiótico.

Palavras-chave: Antibióticos. Stewardship. Espectroscopia Raman. Nanotecnologia.

## ABSTRACT

MARANGONI, Caroline Guimarães Pançardes da Silva. **Antimicrobial Stewardship: a contribution based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy - SERS**. 2022. 101 p. Dissertation (Master in Biomedical Engineering) – Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2022.

The discovery of penicillin in 1928 was considered one of the most critical advances in the history of medicine, because only with the use of antimicrobials was it possible to treat infections previously incurable. However, over time, microorganisms have developed resistance mechanisms to these drugs, due to indiscriminate use. The emergence of multi-resistant bacteria (MDR), the harmful bacteria, is considered a severe public health problem that, according to WHO forecasts, could lead to 10 million deaths/year by 2050. The challenge of developing new antimicrobials brings with it the need to verify the effectiveness of the existing ones, as well as a better understanding of the mechanisms of resistance, hence the importance of developing fast and low-cost techniques for monitoring the action of antibiotics. Here we present an alternative based on nanophotonics that consists of the use of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) mediated by different nanoparticles, for the detection of antimicrobials, with emphasis on some  $\beta$ -lactam antibiotics commonly prescribed in critically ill patients. The experiments proved the possibility of identifying spectra with characteristic vibrations (fingerprints) of these antimicrobials, via SERS, with the evidence that this technology is a great contributor to the Antimicrobial Stewardship program, because it makes it possible to identify unique molecules and also the degradation of the antibiotic.

Keywords: Antibiotics. Stewardship. Raman Spectroscopy. Nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Cultura de Staphylococcus aureus com Penicillium notatum encontrada por Alexandre Fleming .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2 - Linha do tempo dos antibióticos .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4 - Anel <math>\beta</math> - Lactâmico .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5 - Estrutura dos antibióticos - Penicilina .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 6 - Estrutura dos antibióticos – Cefalosporinas. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7 - Estrutura dos antibióticos – Carbapenêmicos. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8 - Estrutura dos antibióticos – Monobactâmicos.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 9 – Estrutura e Classificação dos Antibióticos - Quinolonas.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 10 - Estrutura Molecular da Vancomicina .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 11 - Molécula de Estreptomicina. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 12 - Transferência Horizontal de Material genético entre microorganismos. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 13 – Mecanismos de Resistência.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 14 - Tipos de Teste de Sensibilidade e o tempo de resultado.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 15 - Causas da Resistência Antibiótica. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 16 - Projeção de Causa de mortes em 2050 .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17 - Elementos Centrais para Gerenciamento de antibióticos. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 18 - Esquema identificando os espalhamentos de luz em uma amostra iluminada.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 19 - Ilustração do espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Anti-Stokes .....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 20 - Ilustração da ressonância de plásmon na superfície .....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 21 - Técnica de Ablação a laser em meio Líquido. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 22 - Ilustração do processo de formação das nanopartículas. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 23 - Moléculas dos Antibióticos <math>\beta</math> – lactâmicos com a sinalização do Anel. ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 24 - Esquema metodológico do experimento com bactérias .....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 25 - Esquemática do experimento.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 26 - Esquema experimental das medidas de espalhamento Raman.....</b>	<b>73</b>

<b>Figura 27 - Amostra de suspensões coloidais de nanopartículas de Ouro (Au) e Prata (Ag).</b> .....	74
<b>Figura 28 -TEM das NP de Ouro (AuNP) e Prata (AgNP).</b> .....	75
<b>Figura 29 - Espectro Raman da Ampicilina em forma de Pó.</b> .....	79
<b>Figura 30 - Espectro Raman Ceftazidima em forma de Pó.</b> .....	80
<b>Figura 31 - Espectro Raman do Meropenem em forma de Pó.</b> .....	80
<b>Figura 32 - Espectros Raman de Antibióticos <math>\beta</math> – lactâmicos.</b> .....	81
<b>Figura 33 - Espectro Raman da amostra P2 de Ampicilina.</b> .....	82
<b>Figura 34 - Espectros Raman da Ampicilina intacta por simulação computacional e por microscopia Raman</b> .....	83
<b>Figura 35 - Espectros da Ampicilina: Raman (Amostra P2), SERS (Amostra P3) com nanopartículas de Bi e simulação</b> .....	84
<b>Figura 36 - Espectros SERS do antimicrobiano ampicilina em contato com a bactéria resistente, com a bactéria sensível e com água por 24 horas.</b> .....	85
<b>Figura 37 - Espectros da ampicilina intacta e com o anel rompido obtidos por simulação computacional.</b> .....	86
<b>Figura 38 – Espectro SERS da Ampicilina em Pó e em solução P3 associado a Nanopartículas de Ouro (AuNP) e Prata (AgNP).</b> .....	87

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1- Relação Técnica dos Antibióticos.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 2- Custos dos Antibióticos Puros.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 3 – Resultados os Tamanhos da NPs de Au e Ag realizados pelo TEM.</b>	<b>75</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 - Publicações relativas à técnica de Espectroscopia Raman. ....</b>	<b>60</b>
<b>Gráfico 2 - TEM - Tamanho médio das NPs de Au e Ag.....</b>	<b>76</b>
<b>Gráfico 3 - DLS Tamanho médio das NPs.....</b>	<b>77</b>
<b>Gráfico 4 - UV-vis: densidade óptica (Extinção) x comprimento de onda.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMR	Bactérias multirresistentes
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
RAM	Resistência Antimicrobiana
NP	Nanopartícula
ATB	Antibiótico
MRSA	Staphylococcus aureus resistente a Meticilina
VRE	Enterococcus resistente a vancomicina
VRSA	Staphylococcus aureus resistente a vancomicina
IRAS	Infecção relacionado a assistência a saúde
SCIH	Serviço de controle de infecção hospitalar
UTI	Unidade de terapia intensiva
AMP	Ampicilina
BAC	Bactéria
RES	Resistente
SENS	Sensível
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
PR	Paraná
LB	Luria Bertani
BS	Bactéria sensível
LBA	Luria Bertani com Ampicilina
BR	Bactéria resistente
CBS	Cultura de Bactéria sensível
CBR	Cultura de Bactéria resistente
AS	Solução com Ampicilina
LASiS	<i>Laser Ablation Synthesis in Solution</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

## LISTA DE SÍMBOLOS

Au	Ouro
Ag	Prata
C	Carbono
O	Oxigênio
CO	Cobalto
Sb	Bismuto
H	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
T	Temperatura
V	Volume
P	Pressão
°C	Graus Celsius
mg	Miligrama
ml	Mililitro
Bi	Bismuto
Nm	Nanometro
μl	Microlitro
mW	Miliwatt
S	Segundo
H	Hora



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Contextualização</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Hipótese</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>22</b>
1.4.1	Objetivo Geral.....	22
1.4.2	Objetivos específicos.....	22
<b>1.5</b>	<b>Estrutura do trabalho</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>História dos antibióticos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Classes antimicrobianas</b> .....	<b>28</b>
2.2.1	$\beta$ – Lactâmicos .....	29
2.2.1.1	<i>Penicilinas</i> .....	30
2.2.1.2	<i>Cefalosporina</i> .....	32
2.2.1.3	<i>Carbapenêmicos</i> .....	33
2.2.1.4	<i>Monobactâmicos</i> .....	34
2.2.2	Quinolonas.....	34
2.2.3	Glicopeptídeos.....	35
2.2.4	Aminoglicosídeos .....	37
<b>2.3</b>	<b>Resistência bacteriana</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos de identificação da resistência bacteriana</b> .....	<b>43</b>
2.4.1	Métodos manuais .....	45
2.4.1.1	<i>Macrodiluição em tubos</i> .....	45
2.4.1.2	<i>Microdiluição em caldo</i> .....	46
2.4.1.3	<i>Etest®</i> .....	46
2.4.1.4	<i>Disco-difusão</i> .....	47
2.4.2	Métodos automatizados .....	47
<b>2.5</b>	<b>Causas e consequências da resistência antimicrobiana</b> .....	<b>49</b>
<b>2.6</b>	<b>Gerenciamento/administração de Antimicrobianos - <i>Antimicrobial Stewardship</i></b> .....	<b>52</b>

<b>2.7</b>	<b>Espectroscopia Raman</b> .....	<b>56</b>
2.7.1	Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície .....	61
<b>2.8</b>	<b>Ablação a laser em meio líquido</b> .....	<b>63</b>
<b>2.9</b>	<b>Técnicas de Caracterização</b> .....	<b>65</b>
2.9.1	Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis).....	65
2.9.2	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS).....	65
2.9.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	65
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>A seleção dos Antibióticos</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparação dos Antibióticos</b> .....	<b>68</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparo da Solução Bacteriana</b> .....	<b>69</b>
<b>3.4</b>	<b>Substratos SERS</b> .....	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>Espectros Raman/SERS</b> .....	<b>72</b>
<b>3.6</b>	<b>Simulação do Espectro Raman</b> .....	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Síntese de nanopartículas via ablação a laser</b> .....	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização Microscopia Eletrônica, DLS e UV-VIS</b> .....	<b>75</b>
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	75
4.2.2	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) .....	76
4.2.3	Absorção Ótica (UV-Vis) .....	77
<b>4.3</b>	<b>Espectros Raman de antibióticos em forma de pó</b> .....	<b>78</b>
4.3.1	Ampicilina .....	78
4.3.2	Ceftazidima .....	79
4.3.3	Meropenem .....	80
<b>4.4</b>	<b>Espectroscopia Raman de antibióticos em forma de solução</b> .....	<b>81</b>
<b>4.5</b>	<b>Simulação de Espectros Raman da molécula Ampicilina intacta</b> .....	<b>82</b>
<b>4.6</b>	<b>Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície de antibióticos em forma de solução</b> .....	<b>83</b>
<b>4.7</b>	<b>Espectro SERS em Soluções Bacterianas</b> .....	<b>84</b>
<b>4.8</b>	<b>Simulação de Espectros Raman da molécula Ampicilina com anel</b>	

**Rompido 85**

<b>4.9</b>	<b>Espectros SERS de Ampicilina com metais convencionais .....</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÃO DE FUTUROS TRABALHOS.....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
	<b>TRABALHOS PUBLICADOS FRUTOS DA PESQUISA.....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão abordadas as circunstâncias que levaram a Organização Mundial da Saúde a decretar a Resistência Antimicrobiana um grande problema de saúde pública mundial. Além de apresentar possível ferramenta para auxiliar no “*ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP*.”

### 1.1 Contextualização

Desde a descoberta da penicilina, em 1928, considerada um dos mais importantes avanços da história da medicina, os microrganismos vêm desenvolvendo, ao longo do tempo, mecanismos de resistência, principalmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos, que são fármacos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas (FLEMING, 1929, VIVAS, BARBOSA, *et al.*, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano 2050, pode haver até 10 milhões de mortes/ano por conta da ausência de tratamento eficaz no combate às Bactérias Multirresistentes (BMR) (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020, O'NEILL, 2014).

A Resistência Microbiana é hoje a maior preocupação para os serviços de saúde mundial, principalmente pelo aumento do tempo de internação e uso de antimicrobianos de amplo espectro nos pacientes acometidos por infecções microbianas resistentes, tornando elevados os custos hospitalares (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020, O'NEILL, 2014, 2016, VIVAS, BARBOSA, *et al.*, 2019).

A pandemia de COVID-19, trouxe ainda mais preocupações com a resistência microbiana, pois muitos pacientes que apresentavam sintomas leves ou doença moderada, tomaram antibiótico como medida preventiva, sendo que os antibióticos só possuem efeito em bactérias e não em vírus. A própria OMS não recomendou o uso de antibióticos nestes quadros (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020, WHO, 2021).

Existem diversos mecanismos que implicam em resistência a antimicrobianos, dentre os quais merecem destaque os relacionados a aspectos genéticos (mutações e transferência horizontal de genes) e bioquímicos (inativação, mudanças de permeabilidade da membrana, entre outros (DŽIDIĆ,

ŠUŠKOVIĆ, *et al.*, 2008, SMITH, Moyra, 2017).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention -CDC*), em 2014, criou um programa de gestão do uso racional de antimicrobianos, o “*Antimicrobial Stewardship*”. Este, objetivou priorizar atividades de controle de infecções, utilizando de estratégias multidisciplinares seguindo os padrões internacionais de segurança do paciente (O’NEILL, 2014).

No Brasil, o número de infecções hospitalares culminou com o aumento nos custos com tratamentos e elevado número de óbitos, o que motivou o governo federal a tomar medidas para sua prevenção. Em 2017, a ANVISA publicou o Plano Nacional para Prevenção e Controle de Resistência a Microbianos no Serviços de Saúde, ou seja, um *Stewardship* em padrões nacionais, que apresentou como objetivo definir estratégias nacionais para detecção, prevenção e redução da Resistência Microbiana em serviços de saúde.

A ANVISA publicou no ano de 2021, um novo manual de Prevenção de Infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde, com o intuito de intensificar as estratégias de redução da resistência antimicrobiana. Nele está sendo abordado diversas recomendações sobre a importância do uso adequado dos antimicrobianos, baseado em perfil epidemiológico, na terapia guiada por testes de sensibilidade e na importância das áreas multidisciplinares, como a enfermagem e microbiologia (ANVISA, 2021).

Ao considerar as recomendações mundiais e nacionais sobre o *Antimicrobial Stewardship*, é imprescindível reconhecer que intervenções multifacetárias, baseadas no envolvimento de todos os profissionais de saúde, podem aumentar a capacidade de motivação na criação de ferramentas com o intuito de avaliar e otimizar o tratamento antimicrobiano durante seu uso (MCNULTY, HAWKING, *et al.*, 2018).

A atual falta de novos antimicrobianos para substituir os que se tornaram ineficazes, traz urgência à necessidade de aferir a ação dos medicamentos existentes por meio de métodos alternativos. (Marangoni, 2022).

Neste contexto da elaboração de ferramentas ou métodos alternativos para otimizar o uso dos antimicrobianos existente, cabe referenciar o potencial

da Espectroscopia Raman. É uma técnica que consiste em iluminar o material a ser analisado e detectar a luz espalhada, oriunda de vibrações moleculares, as quais contém informações específicas sobre as moléculas que compõem o material (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, GALVAN, YU, *et al.*, 2006, QIAN, SHAO, *et al.*, 2020).

O conjunto dessas vibrações, que aparecem na forma de picos no espectro da luz espalhada, forma uma impressão digital do material. Porém, os sinais Raman são muito pequenos, de modo que, para ampliar estes sinais, nanoestruturas como nanopartículas precisam ser empregadas. Quando um material (analito) se encontra adsorvido, ou seja, aderido nas nanoestruturas, ocorrem interações de efeito químico e também um significativo efeito físico, que aumenta o campo elétrico, dando o dito efeito plasmônico, que chamamos de efeito SERS (*Surface-enhanced Raman Spectroscopy*), que pode amplificar o sinal Raman, possibilitando assim a detecção de uma única molécula (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, KNEIPP, KNEIPP, *et al.*, 2006, LIU, Chia Ying, HAN, *et al.*, 2016).

O potencial da espectroscopia SERS apresenta-se, portanto, como um ponto de partida altamente promissor na ciência e na tecnologia, com implicações evidentes no campo da nanomedicina e na área da saúde, inclusive para o monitoramento de medicamentos, dado o potencial de rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica Raman (KNEIPP, KNEIPP, *et al.*, 2006, LIU, Chia Ying, HAN, *et al.*, 2016, LIU, Haitao, WANG, *et al.*, 2019).

## 1.2 Hipótese

A Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS (*Surface-enhanced Raman Spectroscopy*)) pode ser uma ferramenta auxiliar na investigação da resistência antimicrobiana e assim contribuir no programa do *Antimicrobial Stewardship*.

### 1.3 Justificativa

Anualmente, aproximadamente 700.000 pessoas adquirem infecções com microrganismos multirresistente e segundo a OMS, no estudo de O'Neill em 2014, os custos com resistência bacteriana poderão chegar a 100 trilhões de dólares até 2050, levando a uma crise econômico-financeira pior que a de 2008 (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020, O'NEILL, 2014).

A situação agravou, principalmente após a pandemia de COVID-19, pois um estudo publicado no final do ano de 2020 avaliou 2.010 prescrições de pacientes acometidos pelo novo Coronavírus e observou que 72% destas prescrições continham terapia antimicrobiana de amplo-espectro, ou seja, antibióticos muito potentes e que atinge uma enorme variedade de bactérias. Contudo, somente 8% destes pacientes realmente apresentaram infecção bacteriana concomitante à viral (RAWSON, ZHU, *et al.*, 2020). Este artigo comprovou a utilização indiscriminada e incoerente dos antibióticos, potencializando a resistência bacteriana.

O uso inadequado de antibiótico vem sendo fortemente desestimulado pela OMS desde 2015, sendo que na 68ª Assembleia Mundial da Saúde, ela implantou o Plano de Ação Global para combater a Resistência Antimicrobiana. Neste plano, foram incluídos 5 (cinco) objetivos fundamentais, dentre eles, otimizar o uso de antimicrobianos e desenvolver abordagens sustentáveis para o desenvolvimento de novos medicamentos e ferramentas diagnósticas (WHO, 2015), sendo os maiores desafios.

Abordagens sustentáveis requerem conhecimento ampliado sobre os mecanismos moleculares dos antimicrobianos, associados ou não a resistência microbiana, suas origens, evolução e principalmente sua disseminação.

Muitos métodos tradicionais usados em estudos de resistência a antibióticos dependem do cultivo bacteriano e da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), incluindo contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e monitoramento das curvas de crescimento, e também os métodos a base de técnicas moleculares, como a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) Essas técnicas de monitoramento tendem a apresentar

alto custo e demandam longos tempos de identificação até o laudo final (ANVISA, 2007a, DŽIDIĆ, ŠUŠKOVIĆ, *et al.*, 2008, MUNITA, ARIAS, 2016).

Sabe-se que a fotônica e nanotecnologia permitem a obtenção de dados biológicos a nível molecular, com potencial para o desenvolvimento de soluções rápidas e de baixo custo (LIU, Chia Ying, HAN, *et al.*, 2016). Esta pesquisa tem a intenção de **apresentar a técnica SERS como ferramenta para caracterização de antimicrobianos  $\beta$  – lactâmicos** em meio aquoso e meio biológico, tendo em vista o desenvolvimento da mesma baseada na identificação precoce da degradação do antimicrobiano em meio biológico, objetivando ser participante ativo do *Antimicrobial Stewardship* para uso a beira leito e com baixo custo.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo Geral

Investigar a aplicação da espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) na detecção de antibióticos  $\beta$  – lactâmicos.

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Descrever o panorama da Resistência Antimicrobiana, no contexto da Saúde pública.
2. Demonstrar a possibilidade da detecção de antibióticos por meio da Espectroscopia Raman Amplificada por superfície (SERS)
3. Analisar a contribuição da ferramenta proposta para o programa de “*Antimicrobial Stewardship*”.

## 1.5 Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado em 6 capítulos. O Capítulo 1, refere-se à introdução, contendo a contextualização, a hipótese, a justificativa e os objetivos da pesquisa. No Capítulo 2, é desenvolvida a fundamentação teórica sobre a



linha do tempo da criação dos antibióticos e sua evolução para a resistência, além de explicar o *Antimicrobial Stewardship* como um programa para tentar sanar o grande problema da Resistência Antimicrobiana. Neste mesmo capítulo, também será demonstrado o método baseado em fotônica da Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície. O Capítulo 3 descreve a metodologia utilizada na pesquisa. O Capítulo 4 apresenta os resultados e discussões obtidos por meio de análise estatística dos espectros e as simulações obtidas no sistema Gaussian. Por último, no Capítulo 5 estão apresentadas as conclusões da pesquisa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo apresenta um dos problemas de saúde pública mundial, a Resistência Antimicrobiana (RA). Descreve prefaciando a História dos antibióticos, a resistência bacteriana e o programa mundial de gerenciamento do uso de antimicrobianos “*Antimicrobial Stewardship*”. Aborda também a metodologia baseada em fotônica da espectroscopia Raman e sua amplificação por superfície.

### 2.1 História dos antibióticos

Há mais de 2.000 anos, principalmente em relatos egípcios e orientais, tratavam-se feridas infectadas com “cataplasmas”, uma espécie de papa medicinal onde misturavam-se solo, raízes, folhas e pão mofado, resultando numa mistura com propriedades antibióticas, ou seja, capaz de matar ou inibir o desenvolvimento de bactérias, as quais somente foram reconhecidas como agentes causadores de doenças infecciosas no século XIX (GELPI, GILBERTSON, *et al.*, 2015, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

Por volta dos anos de 1900, as doenças infecciosas representavam 30% das mortes. Eram causadas principalmente pela tuberculose, pneumonia, doenças sexualmente transmissíveis e doenças diarreicas (BAX, 1998, COHEN, 2000, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019). A sífilis era a doença que mais castigava os homens e foi neste período que Paul Ehrlich<sup>1</sup> desenvolveu o *Salvarsan* (Arsênico da Salvação), um composto sintético baseado no arsênico, que foi considerado a primeira droga anti-infecciosa, ao qual deu início aos estudos de drogas sintéticas (GELPI, GILBERTSON, *et al.*, 2015, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

Mesmo com os estudos sobre drogas anti-infecciosas em andamento, ainda era um grande pesadelo pensar em infecções, principalmente as pediátricas, as quais no início do século XX apresentavam uma estimativa de óbito de quase 10% até o quarto ano de vida (BAX, 1998, COHEN, 2000,

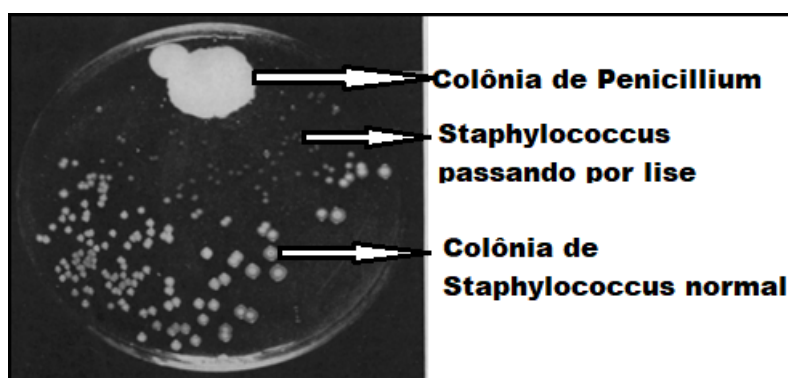
---

<sup>1</sup> Paul Ehrlich (1854 – 1915) médico bacteriologista Alemão, considerado o Pai da quimioterapia.

HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019). Neste período, um dos problemas mundiais de saúde pública eram as infecções que não possuíam tratamento, pois não existiam fármacos para combatê-las.

Em 1928, Alexandre Fleming<sup>2</sup>, em uma das suas experiências, esqueceu durante suas férias, uma placa de Petri contaminada com *Staphylococcus aureus* (Figura 1) e percebeu ao retornar, que a placa estava com um mofo, e que onde existia o fungo aparecia um halo transparente, ao qual ele concluiu que poderia ter efeitos bactericidas (FLEMING, 1929).

**Figura 1- Cultura de *Staphylococcus aureus* com *Penicillium notatum* encontrada por Alexandre Fleming**



Fonte: Adaptado de (FLEMING, 1929).

Ao se intrigar com este halo transparente, Fleming revolucionou a história da medicina, quando identificou o fungo como sendo do gênero *Penicillium notatum*, comprovando que este era capaz de inibir o crescimento bacteriano porque apresentava uma substância antiestafilocócica que ele nomeou de “penicilina” (AMINOV, 2010, DAVIES, DAVIES, 2010, FLEMING, 1929).

Cabe lembrar, que Louis Pasteur descreveu a antibiose, ou seja, a união de organismos que prejudicam ou inibem a ação de outros e graças a esta descrição, foi possível Fleming entender e caracterizar a cultura inovadora.

Contudo, somente 11 anos após esta descoberta fundamental, ao continuar os estudos, Fleming juntamente com Ernst Chain e Howard Florey, conseguiram isolar, purificar e transformar a penicilina utilizável para aplicação clínica. Diversos casos de sucesso com o uso da penicilina foram reportados,

---

<sup>2</sup> Alexander Fleming (1881-1955) foi um médico bacteriologista escocês.

porém, somente após a Segunda Guerra Mundial as indústrias farmacêuticas começaram a produzi-la em larga escala. Esta descoberta fez com que Fleming, Chain e Flory ganhem o Prêmio Nobel de Medicina em 1945 (AMINOV, 2010, DAVIES, DAVIES, 2010).

Gerhard Domagk<sup>3</sup>, ao dar continuidade aos estudos de Paul Ehrlich, desenvolveu o primeiro antibiótico de amplo espectro com base em produtos sintéticos para uso clínico contra o *Streptococcus*, o Prontosil (sulfonamidocrysoidina (KI-370)), fármaco que deu origem a família das sulfonamidas (AMINOV, 2010). Este antibiótico foi usado e testado na própria filha do Domagk, resultando na salvação do braço da menina, que por conta da bactéria *Streptococcus*, estava para ser amputado (HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

Ao final dos anos de 1930, Selman Abraham Waksman<sup>4</sup> descobriu a estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose. Esta descoberta também rendeu a ele um Prêmio Nobel de Medicina em 1952. Porém, o que mais o deixou famoso foi o fato de ser nomeado o “pai dos antibióticos” (DAVIES, DAVIES, 2010, KRESGE, SIMONI, *et al.*, 2004).

Waksman, além de caracterizar o antibiótico como sendo um composto orgânico a base de um microrganismo para destruir outro microrganismo, foi considerado um dos pesquisadores mais incentivadores dos compostos antimicrobianos, pois doava quase todo o dinheiro das patentes e licenças que recebia para continuar as pesquisas com microbiologia e antibióticos (DAVIES, DAVIES, 2010, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019, KRESGE, SIMONI, *et al.*, 2004).

Com a descoberta da penicilina, a era de ouro dos antibióticos e o grande sucesso sobre as bactérias, passaram a ser um marco histórico, principalmente porque naquele momento, acreditava-se que os antibióticos tinham solucionado

---

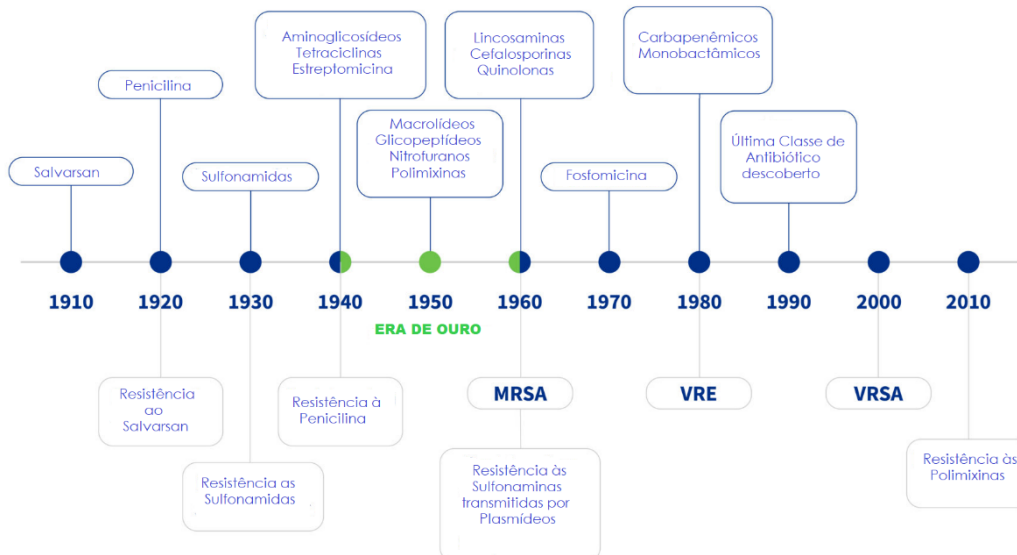
<sup>3</sup> Gerhard Johannes Paul Domagk (1895-1964) médico bacteriologista, nasceu em Brandemburgo na Alemanha.

<sup>4</sup> Selman Abraham Waksman (1888-1973) bioquímico ucraniano, nasceu na cidade rural ucraniana de Novaya Priluka e naturalizado estadunidense.

um problema que tanto causara mortalidade na população mundial da época (COHEN, 2000, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

Com o decorrer do século XX, diversos antibióticos foram descobertos e desenvolvidos. Concomitante, o processo de resistência antimicrobiana vem aparecendo, mostrando que a cada novo antibiótico, as bactérias vão se adaptando e criando novos mecanismos de resistência (HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019). A fim de demonstrar estes acontecimentos, uma linha do tempo é apresentada na Figura 2. Pode-se observar na Figura 2 que na década 60, aparecem os primeiros casos de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina), na década de 80 os casos de VRE (*Enterococcus* resistente à vancomicina) e nos anos 2000 os casos de VRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina), demonstrando que a cada evolução de uso dos antibióticos desenvolvidos, uma nova resistência foi se criando, estas já como enzimas de resistência.

**Figura 2 - Linha do tempo dos antibióticos**



**Fonte: Adaptado de García (2022)**

No mundo todo foi possível observar a grandiosidade da ação dos antibióticos. Nos países de Gales (Reino Unido - Inglaterra, Escócia e Irlanda do Norte), as mortes por febre puerperal, causada por *Streptococcus pyogenes*, caiu 50%. Nos Estados Unidos, entre 1938 e 1952, a taxa de mortalidade por

infecções caiu para 8,2%, sendo mais expressivo na tuberculose e na Pneumonia (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020, COHEN, 2000).

A credibilidade nos antibióticos era tão esplendorosa que em 1969, o cirurgião geral Willian H. Stewart declarou no Congresso Americano que “*era hora de fechar o livro sobre as doenças infecciosas*”, em outras palavras, para ele e para outros profissionais da saúde da época, as doenças causadas por microrganismos era um problema resolvido (BAX, 1998, COHEN, 2000, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

Por conta desta declaração e o sucesso dos antibióticos, os estudos e as atividades de prevenção de doenças infecciosas foram perdendo recursos, levando a indústria farmacêutica a acreditar que havia antibióticos suficientes para as infecções existentes, reduzindo o desenvolvimento de novos medicamentos relacionados a infecção, passando então a focar na produção de fármacos ligados a doenças não infecciosas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares (COHEN, 2000, HUTCHINGS, TRUMAN, *et al.*, 2019).

## **2.2 Classes antimicrobianas**

Os Antimicrobianos são fármacos utilizados para tratamento de agentes infecciosos e são capazes de lesar ou matar os microrganismos invasores sem prejudicar as células do hospedeiro, podendo este, ser humano ou animal (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

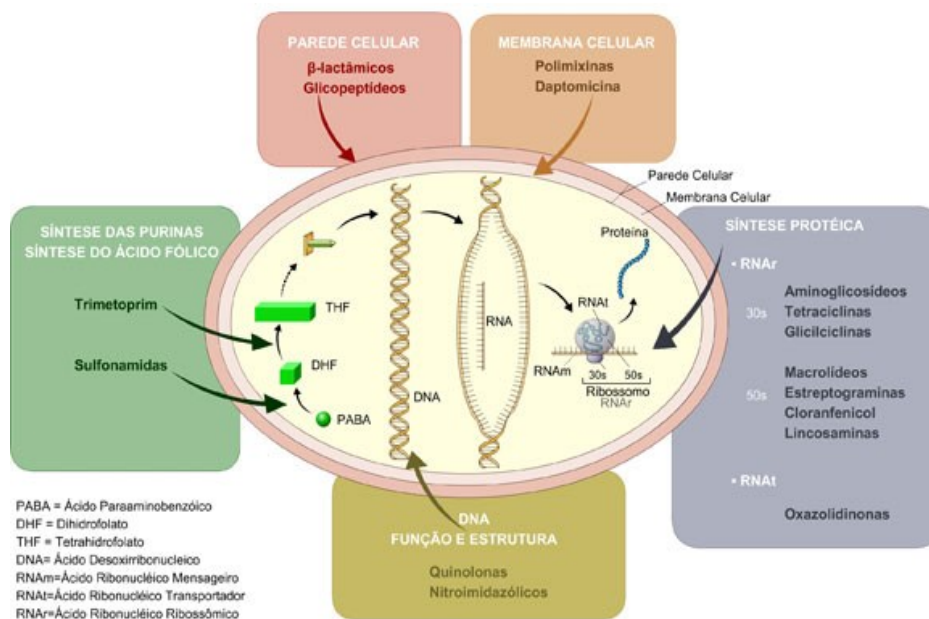
Estatísticas globais sobre o uso de antibióticos apontam um aumento de 35% no consumo entre 2000 e 2010. Países como a Rússia, Índia, China, Brasil e África do Sul representam um total de 76% no consumo destes antibióticos. (VAN BOECKEL, GANDRA, *et al.*, 2014).

Os antibióticos podem ser classificados quanto a sua ação final, especificamente como bactericidas ou bacteriostáticos, sendo capazes de eliminar ou impedir o crescimento e a multiplicação das bactérias (LEVINSON, 2010).

Também podem ser classificados pelo seu mecanismo de ação: a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica; desestabilização da membrana do celular bacteriana; interferência na síntese de

ácido nucleico (DNA); e também na inibição da síntese de folato (síntese das porinas e do ácido fólico), vide Figura 3 (ANVISA, 2007b, NOGUEIRA, XAVIER, *et al.*, 2016).

**Figura 3 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos**



**Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007a)**

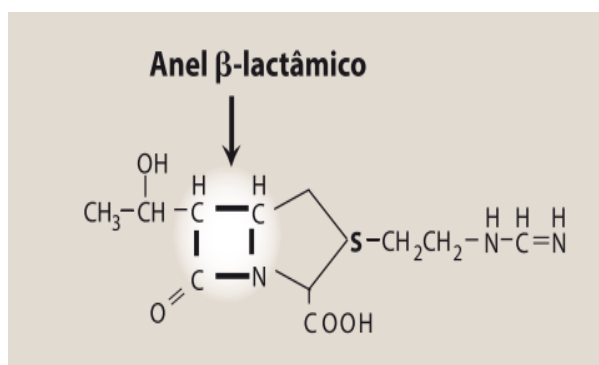
A escolha do antimicrobiano deve ser baseada sempre na identificação do microrganismo, na suscetibilidade do organismo para com o fármaco escolhido, o local da infecção, estado clínico do paciente. (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016). Este último é de suma importância, pois uma terapia antibiótica interrompida poderá causar uma resistência antimicrobiana e, como consequência, causar o óbito do paciente.

Neste trabalho, serão apresentadas algumas das principais classes de uso clínico hospitalar e ambulatorial, tais como: a família dos β – Lactâmicos, Quinolonas, Glicopeptídeos e Aminoglicosídeos. Contudo neste Trabalho, na metodologia escolhemos somente a classe dos beta

### 2.2.1 β – Lactâmicos

Esta classe possui sua origem na penicilina, com o mesmo núcleo estrutural de 3 átomos de carbono e 1 de nitrogênio, ao qual forma o anel  $\beta$  – lactâmico, conforme mostrado na Figura 4. Este anel  $\beta$  – lactâmico é o ativo bactericida do fármaco (AZEVEDO, 2014). Contudo, este anel necessita estar ligado a pelo menos a um radical presente na estrutura molecular, a fim de conferir sua atividade farmacológica (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

**Figura 4 - Anel  $\beta$  - Lactâmico**



**Fonte: Adaptado de Whalen, Richard *et al.* (2016).**

Os  $\beta$  – lactâmicos é a principal classe de antimicrobianos utilizada na prática clínica por serem seguros e também possuírem baixa toxicidade (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, AZEVEDO, 2014). O mecanismo de ação dos  $\beta$  – lactâmicos é agir na síntese da parede celular bacteriana, atuando especificamente na ligação cruzada dos peptidoglicanos, causando a lise/morte da bactéria (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

O que diferencia os  $\beta$  – lactâmicos, entre eles, são os radicais da sua estrutura. Estas alterações químicas são capazes de gerar características como afinidade ao receptor, espectro de ação e até mesmo formas diferentes de resistências. Podem ser subdivididos em Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenêmicos e Monobactâmicos (ANVISA, 2007b, ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

### 2.2.1.1 *Penicilinas*

A penicilina foi um dos primeiros antimicrobianos a ser utilizado em humano e é ainda muito utilizada para tratamentos atuais. Revolucionou

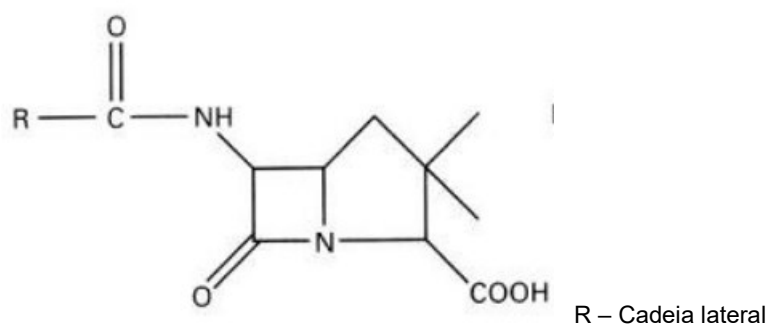


totalmente o tratamento de doenças infecciosas, causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

A penicilina é produzida pelo fungo *Penicillium*. Porém, para conferir sua ação no meio de cultura, são adicionados compostos como o ácido fenilacético, ao qual produz a Penicilina G. (WRIGHT, 1999), conhecida como Benzilpenicilina (Benzetacil®).

Mesmo a penicilina sendo valiosa, possui desvantagens. Ela é facilmente degradada pelas beta-lactamases, enzimas de degradação dos  $\beta$  – lactâmicos. Com a evolução dos anos e com o conhecimento sobre as enzimas degradatórias, foi possível a descoberta do 6-APA (ácido 6-aminopenicilânico), a base da fermentação do mesmo fungo. Esta nova característica molecular, conforme mostra a Figura 5, coadjuvante ao anel  $\beta$  – lactâmico, possibilitou ao desenvolvimento de diversas outras penicilinas de cunho semissintéticas, que configuraram uma forma mais resistente as beta-lactamases (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, AZEVEDO, 2014).

**Figura 5 - Estrutura dos antibióticos - Penicilina**



**Fonte: Adaptado de Williams (1999)**

Com base nestas novas formulações e também da adaptação das bactérias a estes novos compostos, foram desenvolvidos compostos que inibem a atividade das beta-lactamases, tendo como exemplo o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (ANVISA, 2007b, ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, AZEVEDO, 2014). Os antibióticos supracitados são amplamente utilizados em tratamentos clínicos, tanto ambulatoriais quanto hospitalares.

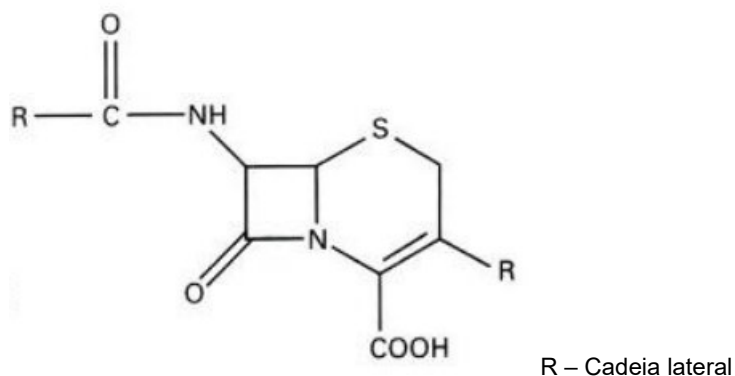
Dentro da classe das penicilinas, devido às inovações, encontram-se as Benzilpenicilinas (penicilina cristalina, penicilina G procaína ou benzatina e a

penicilina V), as Aminopenicilinas (Ampicilina e Amoxicilina), as Penicilinas Resistentes às Penicilinases (oxacilina, meticilina, carbenicilina, ticarcilina e Piperacilina) e as Penicilinas de Ampla Espectro, as quais são obtidas pela associação dos inibidores de Beta-lactamases (amoxicilina com ácido clavulânico, ticarcilina com ácido clavulânico, Ampicilina com sulbactam e piperacilina com tazobactan) (ANVISA, 2007b, WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

### 2.2.1.2 Cefalosporina

As cefalosporinas possuem o mesmo mecanismo de ação das penicilinas e também são afetadas pelos mesmos mecanismos de resistência, porém conseguem conferir ação sobre algumas beta-lactamases. São produzidas semissinteticamente, ou seja, possui acréscimo das suas cadeias laterais ao 7-ACA (ácido 7-amino-cefalosporâmico), de acordo com a Figura 6 (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

**Figura 6 - Estrutura dos antibióticos – Cefalosporinas.**



**Fonte: Adaptado de Williams (1999)**

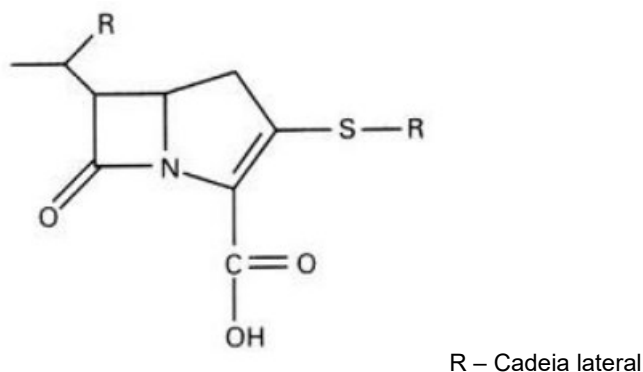
São divididas em 5 gerações e classificadas quanto ao seu espectro de ação: 1ª Geração (cefazolina, cefalotina, cefaloridina, ceradroxil, cefaxelina, cefazitrina); 2ª Geração (cefamandol, cefaclor, cefuroxima, cefomicida, cefoxitina, cefotetan); 3ª Geração (cefotaxima, cefsulodina, ceftazidima, cefoperazona, Ceftriaxona, cefixima); 4ª Geração (cefepime, cefpiroma) e 5ª Geração (ceftaroline, ceftobiprole) (ANVISA, 2007b, ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

### 2.2.1.3 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antibióticos do grupo dos  $\beta$  – lactâmicos que representam atualmente a última opção terapêutica para combate de bactérias multirresistentes, pois apresentam um amplo espectro de ação contra bactérias do tipo Gram-negativa e Gram-positiva (AZEVEDO, 2014), além de cobertura para cepas produtoras de ESBL (Betalactamase de Espectro Expandido). Sua estrutura química, conforme Figura 7, é uma cadeia pentacíclica insaturada ligada ao átomo de carbono, formando o anel carbapenema junto ao anel  $\beta$  – lactâmico (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

As propriedades farmacológicas dos carbapenêmicos oportunizam a capacidade do fármaco de não produzir toxicidade renal, devido não serem degradados pelas peptidases renais (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

**Figura 7 - Estrutura dos antibióticos – Carbapenêmicos.**



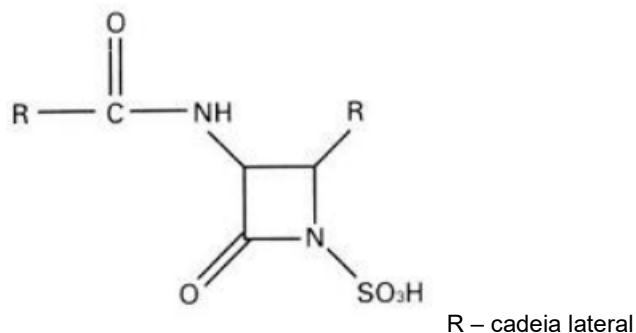
**Fonte Adaptado de Williams (1999)**

Atualmente, temos disponíveis no Brasil, apenas três drogas carbapenêmicas: o Imipenem, Meropenem e o Ertapenem. Cabe ressaltar que em caso de resistência aos carbapenêmicos, as enzimas que degradam estes fármacos são conhecidas como carbapenemases. Estas, por sua vez se tornam muito significativas e importantes para saúde pública, pois além de degradarem os carbapenêmicos, possuem o poder de degradar os demais  $\beta$  – lactâmicos (ANVISA, 2007b, ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019).

#### 2.2.1.4 Monobactâmicos

O Monobactâmicos são fármacos que apresentam em sua estrutura molecular, Figura 8, apenas um anel  $\beta$  – lactâmico monocíclico, e por conta disso seu espectro de ação é limitado apenas à bastonetes gram-negativos aeróbios, bactérias que necessitam de oxigênio para sobreviverem, e não apresentam ação sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativos anaeróbios, bactérias que vivem sem a necessidade de oxigênio. No Brasil somente existe como representante desta classe o Astreonam. (ANVISA, 2007b, ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, AZEVEDO, 2014).

**Figura 8 - Estrutura dos antibióticos – Monobactâmicos.**



**Fonte: Adaptado de Williams (1999)**

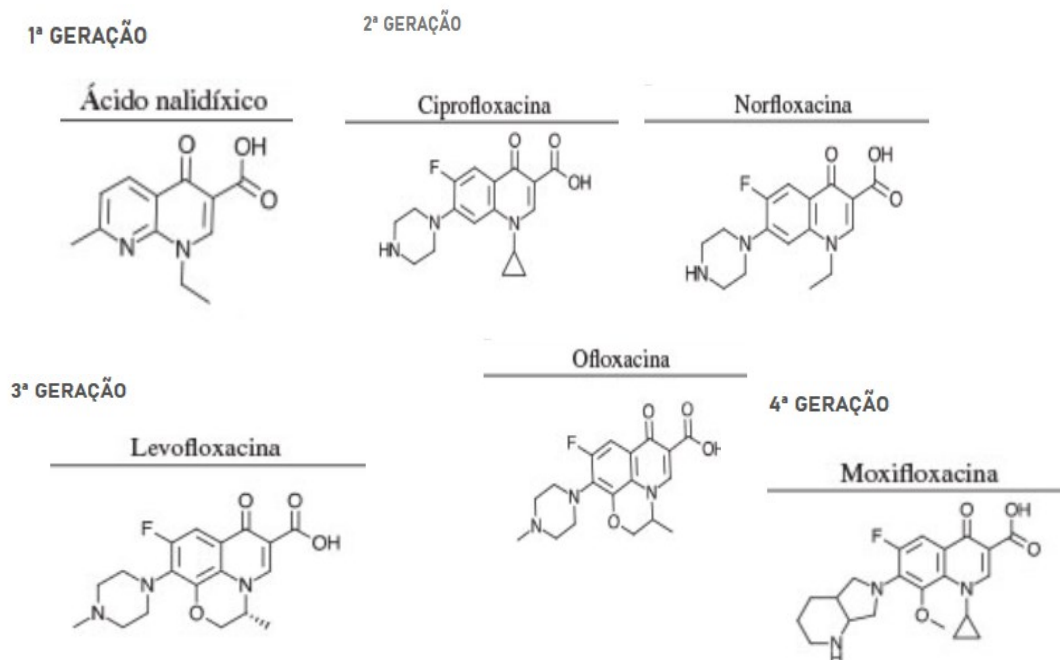
#### 2.2.2 Quinilonas

No início dos anos 60, o ácido nalidíxico, produzido a partir da cloroquina (medicamento destinado para malária), deu origem a utilização das Quinilonas (vide Figura 9) na prática clínica. Com base nesta estrutura principal, diversas outras foram desenvolvidas, sendo que a mais importante e significativa foi a adição do átomo de Flúor, ampliando o espectro de ação para as bactérias Gram-positivas, passando para a nomeação de Fluoroquinolonas (RODRIGUES-SILVA, MANIERO, *et al.*, 2014).

As Quinolonas dependem de entrarem na bactéria através das proteínas de membrana, as Porinas, para que no meio intracelular possam inibir a replicação do DNA bacteriano, agindo especificamente nas enzimas de DNA girase (topoisomerase II e IV) durante o crescimento bacteriano. Este

processo interfere no fechamento do DNA ao final da sua replicação causando a morte celular (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

**Figura 9 – Estrutura e Classificação dos Antibióticos - Quinolonas.**



Fonte: Adaptada de Rodrigues-Silva, Maneiro *et al.* (2014)

Atualmente, existem 4 gerações de Quinolonas conforme mostrada na Figura 10, baseadas no espectro de ação: 1ª Geração - bactérias Gram-negativas aeróbicas, excluindo as *Pseudomonas* (Ácido nalidíxico), a partir da 2ª Geração, aparecem as Fluoroquinolonas, que são capazes de atuarem nas *pseudomonas* e alguns Gram-positivos (Ciprofloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino), 3ª Geração - uma melhor amplitude de ação quanto as bactérias Gram-positivas, em especial os *Streptococcus pneumoniae* (levofloxacino) e a 4ª Geração - ação contra microrganismos anaeróbios (Moxifloxacino) (RODRIGUES-SILVA, MANIERO, *et al.*, 2014, WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

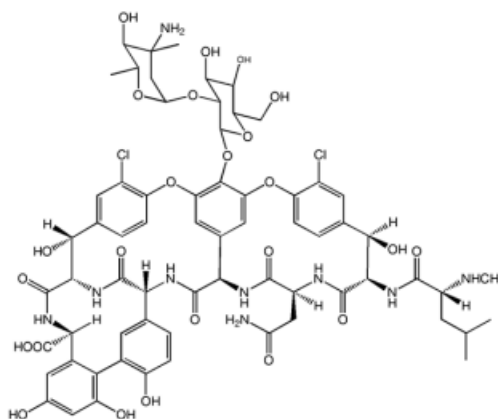
### 2.2.3 Glicopeptídeos

Os glicopeptídeos utilizam o mesmo mecanismo de ação dos  $\beta$  – lactâmicos. Inibem a síntese do peptideoglicano, contudo neste caso, agem na

alteração dos terminais dipeptídico D-Ala-D-Ala, impedindo a ação das transpeptidases, desta forma impossibilitando a ligação entre os peptidoglicanos causando o enfraquecimento da parede e por consequência a lise/morte celular (TERRA, SILVA, 2017, WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016). Além de atuarem na parede celular, também agem na permeabilidade da membrana citoplasmática e na síntese de RNA (ANVISA, 2007b).

Existem dois representantes de glicopeptídeos atualmente: a Vancomicina e a Teicoplanina. Ambos possuem ação em bactérias Gram-positivas, especialmente a Vancomicina, pois é amplamente utilizada em nível hospitalar, como a opção terapêutica para casos de infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes do tipo MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina) e para *Enterococcus sp.* (ANVISA, 2007b). A estrutura molecular da Vancomicina é formada por complexo tricíclico, compostos de amida, álcool, fenol e ácido carboxílico derivado de cepas *Amycolatopsis orientalis* e purificada cromatograficamente, como se apresenta na Figura 10 (TERRA, SILVA, 2017, WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016).

**Figura 10 - Estrutura Molecular da Vancomicina**



**Fonte: Vila *et al.* (2007)**

A Vancomicina é sem sombra de dúvidas o antibiótico mais poderoso para uso hospitalar com foco nas Gram-positivas, porém deve ser utilizada com muita cautela, pois apresentam efeitos colaterais e toxicidade importantes (CLAUDIA, 2013). Os mais comuns são: a “Síndrome do Homem Vermelho” que é um quadro de vermelhidão principalmente no rosto causado pela velocidade

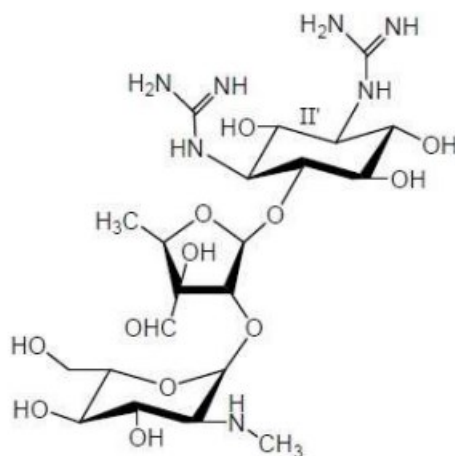
da infusão da droga, a leucopenia e a nefrotoxicidade. Muitas instituições utilizam de métodos quantitativos (vancocinemia) para monitoramento do tratamento da Vancomicina, afim de evitar lesões renais (ANVISA, 2007b).

#### 2.2.4 Aminoglicosídeos

São antibióticos que atuam estritamente em bacilos gram-negativos aeróbios (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016). Apesar de serem muito usados na clínica hospitalar, os aminoglicosídeos possuem alta toxicidade, como nefrotoxicidade, ototoxicidade e paralisia neuromuscular (ANVISA, 2007b, OLIVEIRA, CIPULLO, *et al.*, 2006).

A estreptomicina foi o primeiro aminoglicosídeo desenvolvido a partir de Actinomicetos (*Streptomyces griseus*), isso por volta dos anos de 1944, para uso clínico no tratamento da Tuberculose (ANVISA, 2007b, GUIMARÃES, MOMESSO, *et al.*, 2010). O nome Aminoglicosídeo se deve ao fato da molécula ser constituída de dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica a um núcleo hexose central (aminociclitol) (WHALEN, RICHARD, *et al.*, 2016), de acordo com a Figura 11. Por apresentar uma atividade com pH levemente alcalino (7,4) e ter uma natureza policatiônica, tem uma facilidade na penetração da parede celular bacteriana em especial, nos Gram-Negativos (GUIMARÃES, MOMESSO, *et al.*, 2010).

**Figura 11 - Molécula de Estreptomicina.**



**Fonte: Ribeiro (2017)**

A ação deste fármaco é bactericida por ligarem-se na subunidade 30s dos ribossomos bacterianos. Com isso, ele impede o movimento do ribossomo junto ao mRNA e por consequência interfere na síntese de proteínas (GUIMARÃES, MOMESSO, *et al.*, 2010). Os aminoglicosídeos disponíveis atualmente para tratamento são: a Estreptomicina, Gentamicina, Tobramicina e Amicacina.

### 2.3 Resistência bacteriana

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Resistência Antimicrobiana ocorre quando o microrganismo (bactérias, fungos, vírus ou parasitas) sofre alteração em seus mecanismos de defesa quando expostos a antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos ou anti-helmínticos). Além disso, cabe ressaltar, que a OMS, considera ainda como ultrarresistentes, os microrganismos resistentes a maioria dos antimicrobianos.

A resistência bacteriana aos antibióticos é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, devido a diminuição da eficácia dos antibióticos. Esta, leva a consequências, tais como: o aumento no tempo de internação, aumento dos custos hospitalares e das taxas de hospitalização, e principalmente, elevação da morbimortalidade da população afetada (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020, O'NEILL, 2014, 2016, VIVAS, BARBOSA, *et al.*, 2019).

Os microrganismos pertencentes ao grupo ESKAPE (Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e espécies de Enterobacter) são atualmente os principais agentes causadores de infecções relacionadas a assistência à saúde, que levam a morte de pacientes críticos e imunocomprometidos (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

Os antibióticos tornaram-se uma intervenção muito necessária, principalmente para procedimentos de saúde complexos, como cirurgias, transplantes de órgãos e tratamento de pacientes com câncer. Contudo, este aumento exacerbado do uso e por consequência o aumento de cepas



resistentes, tem prejudicado estes procedimentos e criticalizando pacientes (MUNITA, ARIAS, 2016).

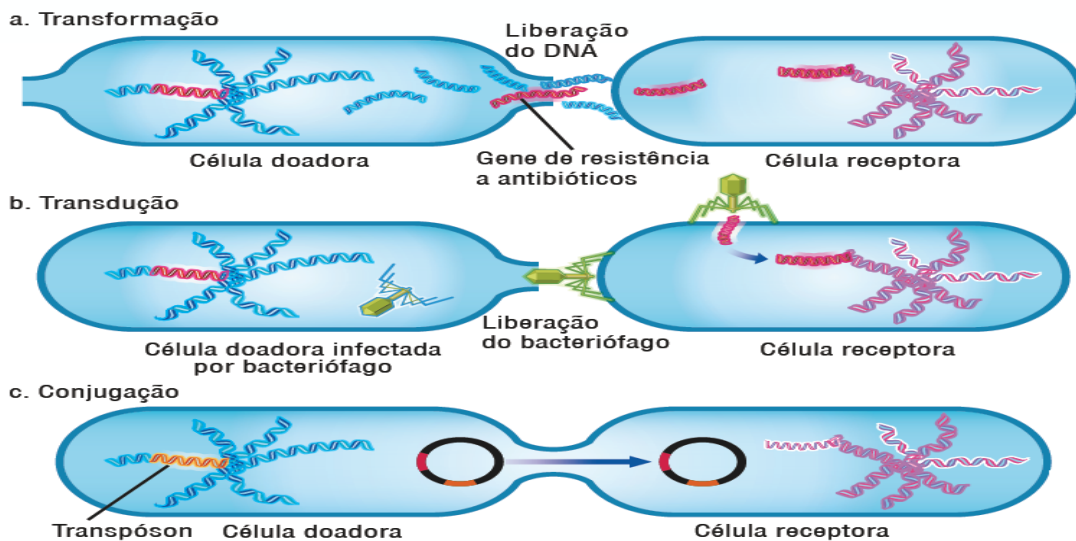
Alexandre Fleming, ao descobrir a penicilina, alertou sobre a importância de utilizá-la com muita cautela, pois seu uso, de forma inadequado, poderia levar a criação de resistência por parte das bactérias (FLEMING, 1929). Pois bem, com apenas dez anos após o uso clínico da penicilina, o alerta de Fleming virou realidade, as primeiras cepas resistentes começaram a ser evidenciadas (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020).

Porém, a resistência das bactérias é muito mais antiga que a criação dos antibióticos. Naturalmente, qualquer organismo vivo possui mecanismos naturais de defesa. Nas bactérias isso é muito relevante, pois elas compartilham o mesmo meio biológico dos compostos antimicrobianos, fazendo que evolutivamente apresentem resistências intrínseca e naturais, aos compostos moleculares dos antibióticos, devido a sua adaptabilidade genética (MUNITA, ARIAS, 2016).

A resistência antimicrobiana é atribuída a diversos fatores, dentre eles a aquisição de genes de resistência, pressão seletiva e disseminação clonal. O aumento do uso inadequado e descontrolado dos antimicrobianos, no atendimento clínico e na agro veterinária, nos últimos dez anos, é considerado a maior causa de disseminação de resistência entre os microrganismos (BARBERINO, 2018).

A resistência bacteriana adquirida é atualmente o perfil mais importante a ser monitorado, pois as bactérias, devido a exposição aos diversos antibióticos, aprenderam a sobreviver ao meio e desenvolveram na sua evolução duas estratégias genéticas de se ajustar ao antimicrobiano. A primeira é a da indução de mutação do DNA original, considerada evolução vertical, que ocorre dentro do nucleotídeo cromossomal e a segunda e mais importante, a transferência de material genético extracromossômico, considerada evolução horizontal, que por sua vez pode se multiplicar em diversos gêneros e espécies (BARBERINO, 2018, MUNITA, ARIAS, 2016). Alguns processos em que ocorre transferência de material genético são apresentados na Figura 12.

**Figura 12 - Transferência Horizontal de Material genético entre microorganismos.**



Fonte: Barberino (2018).

Na evolução horizontal, os microorganismos apresentam três vias de transferência de genes entre gêneros e espécies. A primeira via é a da Transformação que ocorre quando a bactéria adquire os genes de resistência por morte da bactéria doadora do material genético. A segunda é a Transdução. Esta via acontece com a ajuda de um bacteriófago, um vírus específico das bactérias, que serve de vetor do gene de resistência. Por último a Conjugação, uma relação de contato direto entre duas bactérias, onde ocorre a transferência do fragmento de DNA resistente via plasmídeo (BARBERINO, 2018), conforme mostrado na Figura 12.

Estes genes transferidos levam a criação de mecanismos de resistência que impedem o antibiótico na sua ação (Figura 13).

**a) Alteração de Permeabilidade:** a bactéria possui em sua estrutura a membrana celular, ou seja, uma parede de proteção. A penetração dos compostos por essa membrana acontece nas proteínas especiais, conhecidas como *porinas*, as quais concebem passagem entre o meio externo e o interior da célula (LEVINSON, 2010). Quando ocorre o efeito de resistência, estes canais de passagem são fechados, impedindo a penetração dos antibióticos (BARBERINO, 2018, MUNITA, ARIAS, 2016).

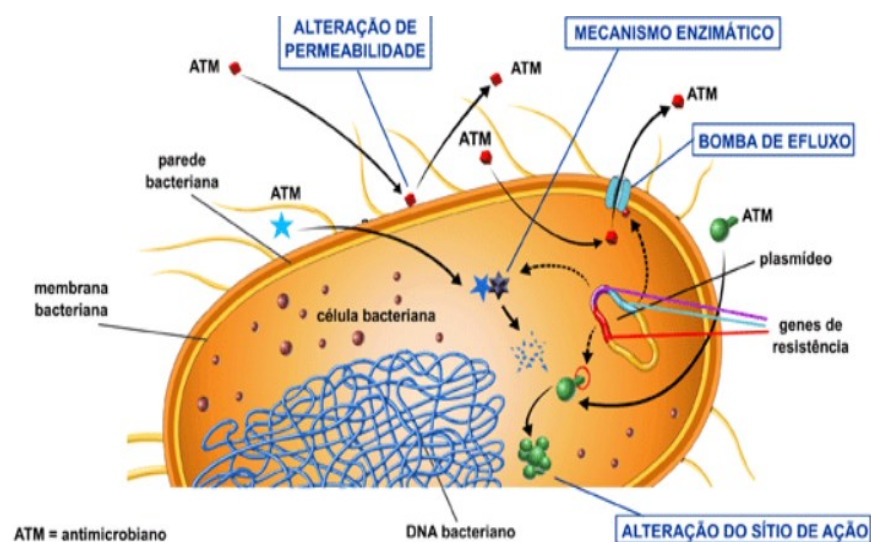
**b) Alteração do sítio de ação:** as moléculas de antibióticos dependem de ter uma ligação molecular interna na bactéria para que o fármaco realize sua ação, um processo muito parecido como uma chave e uma fechadura, que precisam de um encaixe correto para trancar e destrancar. Por meio dos genes de resistência, a bactéria consegue alterar este código de ligação entre a molécula do antibiótico e a bactéria (BARBERINO, 2018, MUNITA, ARIAS, 2016). Um dos principais e mais importantes mecanismos de alteração do sítio de ação acontece nas PBPs (*Penicillin Binding Proteins*). Estas são enzimas que auxiliam na ligação cruzada entre os polímeros de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, aos quais formam os peptideoglicanos, ou seja, a parede celular bacteriana (COSTA, SILVA JUNIOR, 2017). Os  $\beta$  – lactâmicos, a maior classe dos antibióticos, agem justamente na inativação destas PBPs, fazendo com que elas, não consigam “costurar” a parede celular causando a lise bacteriana. Contudo, quando ocorre a alteração do mecanismo de ação, estas PBPs conseguem modificar ou criar novas ligações moleculares, impossibilitando a ação dos  $\beta$  – lactâmicos (BARBERINO, 2018, MUNITA, ARIAS, 2016).

**c) Bomba de efluxo:** Na membrana da bactéria existem diversas proteínas, sendo que algumas delas exercem a função de canal extrusor, ou seja, passagem do meio intracelular para o extracelular. Estas proteínas possuem a função de expulsar compostos nocivos como antibióticos e desinfetantes, de dentro da bactéria (LEVINSON, 2010). Através do gene de resistência, a bactéria reconhece o fármaco e utilizando dessas proteínas extrusoras, expulsa a molécula do antibiótico, ocasionando assim a não ação do fármaco (BARBERINO, 2018, DA SILVA, Pedro Eduardo Almeida, VON GROLL, *et al.*, 2011).

**d) Mecanismo enzimático:** Este é considerado o principal e o mais prevalente mecanismo de resistência das bactérias, especialmente as GRAN Negativas, pois por meio da codificação dos genes, tanto por plasmídeos (moléculas extra cromossômicas circulares de DNA) ou transposons (“genes saltadores”, fragmentos de DNA codificante que possuem capacidade de mudar de localização), a bactéria cria enzimas, que degradam ou inativam as moléculas de antibióticos (BARBERINO, 2018, LAVAGNOLI, BASSETTI, *et al.*, 2017,

MUNITA, ARIAS, 2016). Existem três principais tipos de enzima que inativam antibióticos descritas atualmente na literatura, porém as mais importantes são as betalactamases. Estas hidrolisam a ligação amida do anel  $\beta$  – lactâmico, abrindo o anel e destruindo a composição molecular que se ligam nas PBPs. Cabe ressaltar que estas enzimas vêm sendo constituídas ao longo do tempo por mutações, principalmente devido à pressão ambiental, ou seja, a utilização excessiva de  $\beta$  – lactâmicos. Mais de mil tipos de betalactamases foram descritas e o mais importante é que nas bactérias Gram-negativas, estas enzimas criam a capacidade de atuarem em conjunto com a barreira de permeabilidade da parede celular, produzindo uma resistência muito mais significativa (ARRUDA, SIQUEIRA, *et al.*, 2019, BARBERINO, 2018).

**Figura 13 – Mecanismos de Resistência.**



**Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007a).**

Se consideramos a Teoria da Evolução de Darwin, o processo de resistência das bactérias é um evento natural da espécie. Porém, este processo foi indiscutivelmente acelerado com o aumento do uso dos antibióticos e pela drástica redução de produção de novos fármacos anti-infecciosos pela indústria farmacêutica (MUNITA, ARIAS, 2016). É necessário, neste cenário de guerra entre antibióticos e bactérias, sempre baseados na multidisciplinaridade, projetar estratégias para controlar e combater a resistência bacteriana.

## 2.4 Métodos de identificação da resistência bacteriana

Como já se sabe, a resistência aos antibióticos é definida como a capacidade genética que as bactérias possuem de codificar os genes de resistência, causando um efeito inibitório de antibióticos (BLAIR, WEBBER, *et al.*, 2015). Os mecanismos de resistência bacteriana incluem a inativação do canal da porina, modificação dos alvos do antibiótico, bomba de efluxo e neutralização da eficácia do antibiótico por meio da ação enzimática. Desta forma, compreender a estrutura genética e as mudanças morfoanatômicas nas bactérias são de importância primordial para neutralizar o mecanismo de resistência (KHAN, SIDDIQUI, *et al.*, 2019).

Para confirmação de um diagnóstico infeccioso é necessário a realização de procedimentos laboratoriais, que perpassam pela coleta de materiais clínicos, colhidos adequadamente no sítio infeccioso, a identificação do microrganismo, teste de sensibilidade aos antimicrobianos e por fim, em alguns casos, análise genética de identificação de cepas resistentes ou até clones (PEREIRA, PETRECHEN, 2011).

A acurácia do resultado microbiano depende de três fases, ou seja, a pré-analítica, analítica e pós-analítica. Na fase pré-analítica encontra-se as etapas da coleta, identificação da amostra e o transporte da amostra clínica. Esta é a primeira fase para isolamento e identificação do microrganismo (ANVISA, 2008b). Cabe ressaltar que a qualidade da amostra é de primordial importância para o êxito do resultado, pois amostras coletadas ou transportadas de forma inadequadas podem provocar dificuldades no isolamento microbiano, podendo causar alterações no resultado e por consequência induzir ao tratamento inadequado (ANVISA, 2008b). Observa-se que devido à importância desta primeira fase, atualmente este procedimento é predominantemente realizado pela equipe de enfermagem, podendo também ser realizado pelo profissional médico, biomédico ou farmacêutico bioquímico.

A fase analítica é o momento em que o microbiologista realiza as etapas: exames microscópicos, detecção de antígenos, isolamento e identificação do agente infeccioso, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos e, em alguns

laboratórios, o estudo molecular por caracterização genotípica para avaliação de resistência microbiana (ANVISA, 2008b).

Por fim, na fase pós-analítica, considerada a de maior relevância, é necessário um bom conhecimento sobre microbiologia e antibiograma para interpretação dos dados (ANVISA, 2008b). É nesta fase que observamos a conduta médica de inserção ou remoção dos antimicrobianos ao paciente, ou seja, é a fase que depende exclusivamente da garantia das duas primeiras para que a vida do paciente seja mantida.

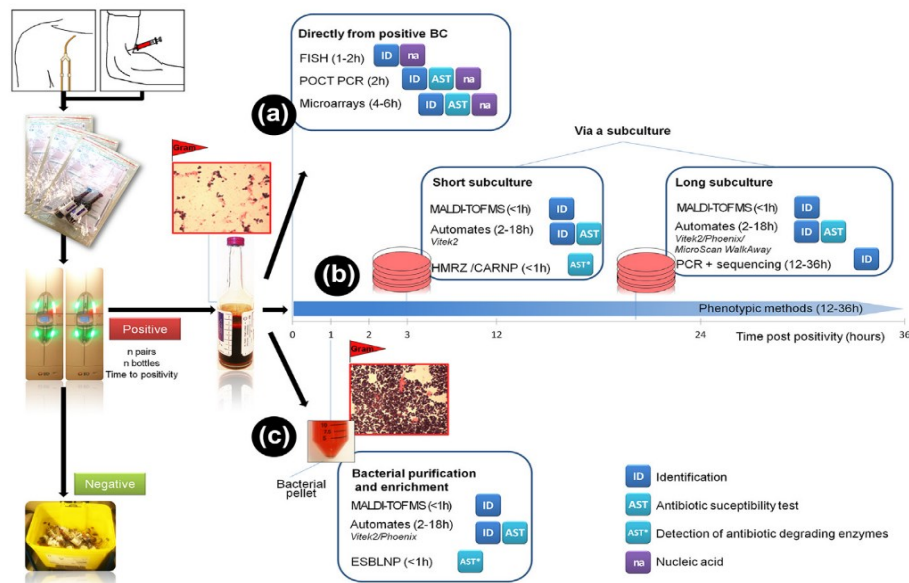
Uma das medidas mais importantes para o tratamento do paciente, é a detecção rápida da sensibilidade antibiótica bacteriana. O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) serve para analisar e identificar quais antibióticos estão sensíveis, intermediários ou resistentes à bactéria que está causando o processo infeccioso (JORGENSEN, FERRARO, 2009). Além disso, o TSA representa uma importante ferramenta no monitoramento da evolução da resistência bacteriana (ANVISA, 2008).

O conhecimento epidemiológico sobre o padrão de sensibilidade/resistência das bactérias nos antimicrobianos orienta a conduta terapêutica para tratamento de pacientes acometido por infecções e principalmente causadas por microrganismos multirresistentes. (GUAREZE, BORDIGNON, 2016).

Dentro do TSA podemos encontrar métodos manuais ou automatizados (ANVISA, 2008a). Atualmente, é possível realizar o TSA diretamente da cultura de sangue positiva, usando métodos baseados em ácido nucleico ou por meio de subculturas em espectrometria de massa MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). (OPOTA, CROXATTO, *et al.*, 2015).

Na Figura 14 é possível observar o tempo de realização do TSA até a entrega do resultado final. Quanto mais manual é o método, mais demorado será o resultado e o inverso também é verdadeiro, quanto mais automatizado, mais rápido o resultado final. Contudo, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. A escolha do método manual ou automatizado vai depender da instituição de saúde em possuir recursos financeiros para aquisição e manutenção do procedimento.

**Figura 14 - Tipos de Teste de Sensibilidade e o tempo de resultado.**



Fonte: Opota, Croxatto, *et. al.* (2015).

A identificação mais rápida e a caracterização da resistência de patógenos podem levar à administração precoce da terapia antimicrobiana guiada por cultura e TSA, promovendo a redução do uso de antibióticos de amplo espectro, consequentemente atuando de forma direta no combate da resistência antimicrobiana (BANERJEE, TENG, *et al.*, 2015).

## 2.4.1 Métodos manuais

### 2.4.1.1 Macrodiluição em tubos

Foi uma das primeiras técnicas a ser utilizada para Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA). Ela se caracteriza pela preparação de oito ou mais tubos de diluições seriadas de antibióticos. Em cada tubo é inserido concentrações diferentes de antibióticos, em escalas logarítmicas. Nestes, é acrescentado uma suspensão bacteriana padronizada contendo  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Após 18 a 24 horas de incubação em estufa com  $35^\circ\text{C}$ , o microbiologista avalia, visualmente, o crescimento bacteriano, por meio da turbidez. Nesta técnica, quanto mais límpida a concentração, menor o crescimento bacteriano, ou seja,

significa que a concentração de antibiótico daquele tubo inibiu a bactéria, desta forma podendo identificar a Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC). Esta técnica tem como vantagem a geração de um resultado quantitativo (ou seja, o MIC), porém apresenta desvantagens, pois é um método muito trabalhoso e manual, considerando que é necessário preparar as soluções de antibióticos para cada teste, com a possibilidade de erros na preparação, além de gastar muito reagente e espaço físico (ANVISA, 2008a) ; JORGENSEN, FERRARO, 2009).

#### 2.4.1.2 *Microdiluição em caldo*

Esta técnica corresponde a miniatura da macro diluição. Utiliza-se uma placa plástica com 96 poços, sendo que cada um contém 0,1ml de volume, com o fundo em formato em “U” para permitir a visualização do crescimento bacteriano. Permite a possibilidade de testar até 12 antibióticos com uma faixa de 8 diluições. Da mesma forma que a macro, a análise de MIC é realizada visualmente. Como vantagens, é possível adquirir a placa preparada comercialmente, economia de espaço, reprodutibilidade e também gerar resultado quantitativo. Contudo, possui desvantagens na inflexibilidade da escolha dos antibióticos quando adquiridas as placas pré-fabricadas e, por consequência, o aumento dos custos (ANVISA, 2008a; JORGENSEN, FERRARO, 2009).

#### 2.4.1.3 *Etest®*

É uma técnica que utiliza tiras de teste de plástico finas, impregnadas na parte inferior com concentrações de antibiótico seco e são marcadas na superfície superior com uma escala de concentração. Até 5 ou 6 tiras podem ser colocadas na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton de 150mm. A placa deve ser apropriadamente inoculada com uma suspensão de organismo padronizada e, em seguida, inserir as tiras. Após a incubação de 12 horas, os testes são lidos observando as tiras do topo da placa. O MIC é determinado pela intersecção da parte inferior da área de inibição de crescimento em forma de elipse com a tira de teste. Como vantagens temos a flexibilidade na escolha dos



agentes antimicrobianos, fácil execução e um resultado quantitativo de MIC. As desvantagens se apresentam no alto custo das fitas e também no número limitado de antibióticos que podem ser testados em função de cada placa (ANVISA, 2008a ; JORGENSEN, FERRARO, 2009).

#### 2.4.1.4 Disco-difusão

É um teste simples e prático. A técnica é realizada na aplicação de bactéria em uma placa de ágar Mueller-Hinton, acomodando sob este esfregaço, 12 discos de antibiótico de papel. As placas necessitam ser incubadas por 16 a 24h a 35°C. A análise é feita na comparação das zonas de inibição de crescimento em torno de cada um dos discos de antibióticos. O diâmetro desta comparação representa à suscetibilidade do isolado e à taxa de difusão do fármaco pelo meio ágar. Os diâmetros das zonas de cada droga são interpretados usando os critérios publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e deste de 2019 pelo BRQUEST. Os resultados do teste de disco-difusão são “qualitativos”, gerando não um valor de MIC, mas laudo de sensível, intermediário ou resistente. As vantagens deste método são a facilidade da execução, reprodutibilidade, uso de reagentes de baixo custo, fácil interpretação e a flexibilidade na escolha dos antimicrobianos que serão testados. Porém, as desvantagens são a falta de mecanização ou automação do teste (ANVISA, 2008a; JORGENSEN, FERRARO, 2009).

#### 2.4.2 Métodos automatizados

Os métodos convencionais para identificação e teste de suscetibilidade de microrganismos a partir de hemoculturas levam mais de 2 dias, causando um atraso na terapia antibiótica e favorecendo a resistência antimicrobiana, devido os pacientes estarem recebendo antibióticos ineficazes ou desnecessários (BANERJEE, TENG, *et al.*, 2015).

Os métodos automatizados contribuem na padronização da leitura, além de produzir resultados de teste de suscetibilidade em um período mais curto do que as leituras manuais (JORGENSEN, FERRARO, 2009). Alguns utilizam de

sistemas de detecção óptica sensíveis para a detecção de mudanças no crescimento bacteriano. No Brasil, encontramos o VITEK®, Vitek-2®, Walk-away® e o BD Phoenix . Alguns testes possuem ainda, a capacidade de identificar simultaneamente o microrganismo e o TSA (ANVISA, 2008a).

Como todos os outros, os testes automatizados apresentam vantagens e desvantagens. São vantajosos no tempo da emissão dos laudos, na padronização intra e inter laboratoriais, e quando se agrega o sistema de computação adicional, reduz significativamente o trabalho manual e a interpretação do resultado. Contudo, necessita de muito recurso financeiro para aquisição e manutenção deste método e ainda apresentam uma falta de sensibilidade em certos mecanismos de resistência, podendo causar laudos errôneos (ANVISA, 2008a, JORGENSEN, FERRARO, 2009).

Em 2016, um estudo realizado em um laboratório de microbiologia do sudoeste do Paraná, comprovou a maior sensibilidade do método automatizado (GUAREZE, BORDIGNON, 2016). Porém, observa-se que ainda hoje, devido a recursos financeiros limitados, muitos serviços de saúde utilizam o método manual.

Outros testes automatizados, tais como o MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) e métodos baseados em ácido nucleico, como PCR e sequenciamento de genes, são utilizados para agilizar os testes de susceptibilidade antimicrobiana. Este teste geralmente necessita de um período de incubação relativamente curto, ou seja, em torno de 6 horas (OPOTA, CROXATTO, *et al.*, 2015).

A MALDI-TOF MS revolucionou o diagnóstico clínico com sua capacidade de identificação de espécies rápida, confiável e econômica. Esta técnica é baseada principalmente em análises de impressões digitais de proteínas ribossomais, que são naturalmente adequadas para identificar bactérias (WEIS, JUTZELER, *et al.*, 2020).

Estudos demonstraram que o MALDI-TOF MS supera os métodos de diagnóstico convencionais em termos de custo, velocidade e precisão na identificação de espécies microbianas (WEIS, JUTZELER, *et al.*, 2020). Os métodos manuais de diagnóstico fenotípico, como o teste de difusão em disco, necessitam de até 48 horas, enquanto o MALDI-TOF MS pode fornecer

informações sobre o patógeno causador em minutos, a partir de culturas cultivadas de 12 horas (JORGENSEN, FERRARO, 2009, WEIS, JUTZELER, *et al.*, 2020).

## 2.5 Causas e consequências da resistência antimicrobiana

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming marcou o início da era de ouro dos antibióticos, gerando uma grande euforia mundial, por tratar de infecções e salvar vidas, pontos primordiais da saúde pública na época, principalmente entre os anos de 1960 e 1970. No entanto, anos depois, a OMS concluiu em seu primeiro Relatório Global sobre Resistência Antimicrobiana que são necessárias medidas para combater a Bactérias multirresistentes ou então estaremos fadados à uma era pós-antibiótica, onde infecções leves e pequenos ferimentos serão novamente fatais (VENTER, HENNINGSEN, *et al.*, 2017).

Segundo a OMS, as causas para a resistência aos antibióticos são o uso excessivo de antibióticos, a não finalização de tratamento pelo paciente, principalmente em uso ambulatorial, o uso excessivo e descontrolado na criação de animais, ovinos e pisciculturas, o baixo controle de infecções relacionadas a saúde, a baixa sanitização e higiene precária e por fim a falta de desenvolvimento de novos antibióticos (Figura 15).

Figura 15 - Causas da Resistência Antibiótica.



Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2017).

A velocidade com que a resistência microbiana está se desenvolvendo, mostra como a ação humana tem papel substancial no desenvolvimento da RAM, pois há uma correlação muito peculiar entre o uso de antibióticos e o desenvolvimento de resistência (VENTER, HENNINGSEN, *et al.*, 2017). O uso inadequado de antibióticos por prescrições inadequadas, são atualmente a maior causa de resistência antimicrobiana no mundo (BATISTA, COELHO, *et al.*, 2021).

Cabe ressaltar que o abuso de fármacos em ambientes veterinários tem sido agravado pelo uso de antibióticos, como a colistina, na alimentação animal. Os antibióticos são indicados para uso terapêutico na alimentação animal, com a finalidade de tratar doenças clínicas, mas também podem ser aplicados profilaticamente para prevenção de doenças e o mais preocupante de todos, com dose subterapêutica, para aumentar o crescimento animal (BEZERRA, W.G.A., HORN, *et al.*, 2017, VENTER, HENNINGSEN, *et al.*, 2017).

O *Food and Drug Administration* (FDA) publicou em 2015, que animais destinados a alimentação humana consumiram 14 mil toneladas de antibióticos. Considerando que estes animais foram destinados a alimentação humana, significa que estamos ingerindo antibióticos. Isso tem sido anunciado como um forte causador de transferência genética entre as bactérias animais e humanas (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020, BEZERRA, W.G.A., HORN, *et al.*, 2017).

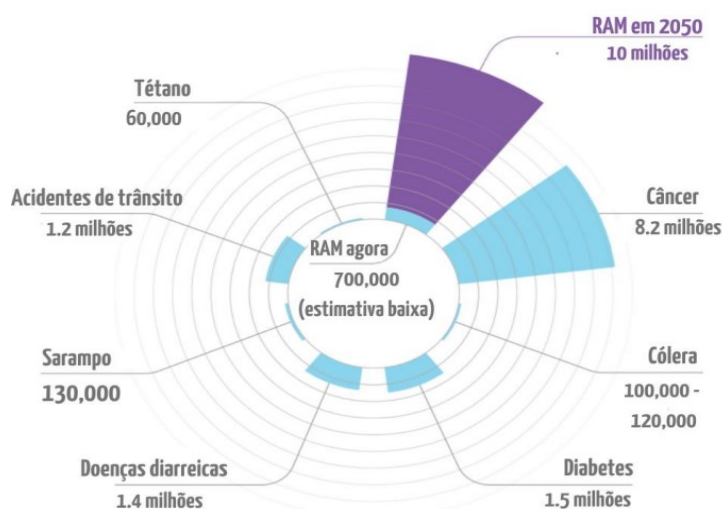
A OMS publicou uma lista dos antimicrobianos que devem ser evitados em tratamentos não humanos, porém é uma recomendação, pois cabe aos produtores aceitar ou não. Todavia, um exemplo claro de descontrole político sobre estes antibióticos, utilizados na agro veterinária, é o que acontece em nosso país. Atualmente, o Brasil é um dos mais expressivos produtores de frango de corte do mundo, atendendo a mais de 150 países, porém não se tem estatísticas oficiais sobre o nome e a quantidade de antibióticos utilizados (BEZERRA, W.G.A., HORN, *et al.*, 2017).

As consequências da resistência antimicrobiana impactam direta ou indiretamente na sustentabilidade alimentar, ambiental e socioeconômica. (HARTINGER, MEDINA-PIZZALI, *et al.*, 2021). O impacto socioeconômico das BMR acarretará custos com atendimentos em saúde, à visão de 1,5 bilhões de euros por ano no mundo (O'NEILL, 2016, WHO, 2017).

Segundo a publicação do *THE WORLD BANK*, haverá aumento da miséria, principalmente em países pobres, devido a Resistencia Antimicrobiana. Esta pesquisa analisou o impacto financeiro mundial entre 2017 e 2050, elencando que o PIB (Produto Interno Bruto) global poderá cair até 3,8% num cenário de alta evolução da Resistência Microbiana. Além disso, afirma que os custos globais com a saúde poderão variar de US\$300 bilhões à 1 trilhão por ano, até 2050. Esta projeção financeira já havia sido mencionada por O'Neill em 2014, ao relatar os custos de alguns países asiáticos para tratar Malária Resistente (MR) com medicações. Todo este custo com tratamento de saúde poderá causar um colapso financeiro compatível a crise econômica mundial de 2008. O relevante será o impacto do PIB em países de baixa renda, podendo chegar a uma queda de 5%, aumentando as taxas de pobreza extrema (WORLD BANK, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, até o ano 2050, morrerão até 10 milhões de pessoas por ano, devido à ausência de tratamento eficaz no combate às Bactérias Multirresistentes (O'NEILL, 2014, VIVAS, BARBOSA, *et al.*, 2019). Na Figura 16 apresenta-se um mapa visual que permite visualizar os riscos associados à resistência antimicrobiana em comparação com outras importantes causas de mortalidade.

**Figura 16 - Projeção de Causa de mortes em 2050**



Fonte: Adaptada de O' Neill (2014).

Calcula-se que aproximadamente quatro milhões de pessoas adquiram, por ano, infecções associadas a assistência à saúde, e com isso ,cerca de 37

mil morrem, e destas 67,6% estão relacionadas a resistência antimicrobiana (SILVA, OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Anualmente, no mundo, mais de dois milhões de pessoas sofrem com doenças infecciosas resistentes a medicamentos e infelizmente 23.000 morrem por não conseguirem tratamento (ANVISA, 2019).

A atual pandemia levou o uso de antibióticos na forma inadequada. Muitos pacientes com COVID-19, com doença leve e sem pneumonia, tomam antibióticos (por exemplo, Azitromicina). Este tipo de tratamento foi amplamente utilizado no mundo todo, porém não recomendados pelas autoridades de saúde, principalmente a OMS (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020), pois era sabido que isso levaria a taxas mais altas de resistência bacteriana com um impacto gigantesco em mortes, tanto durante a pandemia e quanto depois dela (THE GUARDIAN., 2020).

Considerando a projeção estimada por O'Neill em 2014, conforme mostrado na Figura 16, a atual pandemia de COVID-19 e as declarações da OMS, pode se considerar que uma nova estimativa de óbitos, bem como impacto econômico, serão divulgadas num futuro próximo, pois cada dia que se passa, novas evidências de aumento da Resistência Antimicrobiana se apresentam. (Menezes, 2021).

## **2.6 Gerenciamento/administração de Antimicrobianos - *Antimicrobial Stewardship***

O Termo "*Antimicrobial Stewardship*" foi originalmente publicado em 1996 por John E. McGowan Jr e Dale N. Gerding nos EUA (Estados Unidos da América). Neste artigo, eles relataram que o termo foi inspirado por uma homilia dominical sobre o evangelho do "bom mordomo", o qual significa que devemos administrar com muito zelo o que é do Senhor. Baseado nisso, os autores destacaram que era necessário considerar os antimicrobianos como um recurso precioso não renovável, por isso tão necessário o "Gerenciamento" (DYAR, HUTTNER, *et al.*, 2017, MCGOWAN JR, J E; GERDING, 1996).

Em 1999, Ian Gould e Jos van der Meer, dois europeus, adotaram o termo e fundam o ESGAP (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Antimicrobial Stewardship*), que ajudou a

ampliar o uso de “Antimicrobial Stewardship” (Gerenciamento/administração de Antimicrobianos) em todo o mundo. Durante as décadas de 1990 e 2000, o programa de Gerenciamento de Antimicrobianos foi desenvolvido e implementado em hospitais dos EUA e na Europa (DYAR, HUTTNER, *et al.*, 2017).

A descrição atualmente citada de *Antimicrobial Stewardship* é a apresentada pela IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) em 2007, com atualização em 2012, onde esclarece que a administração de antimicrobianos é um conjunto de intervenções coordenadas, destinadas a melhorar e medir o uso apropriado de agentes antimicrobianos, promovendo a utilização adequada do antimicrobianos, incluindo dosagem, duração da terapia e via de administração (DELLIT, OWENS, *et al.*, 2007).

Após a publicação de O’Neill em 2014, sobre o impacto da resistência antimicrobiana, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), reuniu os serviços de saúde nos Estados Unidos e publicou “***The Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs***”. Este foi um programa de gestão do uso racional de antimicrobianos que objetivava priorizar atividades de controle de infecções, utilizando de estratégias multidisciplinares, como treinamentos e apoio institucional, seguindo os padrões internacionais de segurança do paciente (CDC, 2014), com sua última atualização em 2019 (CDC, 2019).

O *Antimicrobial Stewardship* otimizou pilares do trabalho multidisciplinares para o atingir seu objetivo central (CDC, 2014):

- **Médicos** – prescrição consciente dos antibióticos;
- **Serviços de infecção relacionado à saúde** – monitoramento, fiscalização, análise dos dados epidemiológicos das infecções;
- **Serviços de qualidade, tecnologia e educação permanente hospitalar** – estratégias de segurança do paciente, com foco em capacitação e agilidade nas informações;
- **Equipe do Laboratório** – análise de culturas, utilizando teste e fluxo de resultados adequados e

- **Enfermagem** – coleta de culturas no tempo e forma corretos e análise contínua dos antibióticos com relação ao tratamento, indicação e duração.

O termo “*Antimicrobial Stewardship*” é encontrado em um número crescente de contextos que utilizam de programas de administração de antimicrobianos, tanto em hospitais quanto na comunidade (DYAR, HUTTNER, *et al.*, 2017). Atualmente com a Implantação “*One Health*”, abordagem baseada na saúde única, que correlaciona a saúde humana, animal e ambiental, como uma saúde conjugada, (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020) também utiliza o contexto *Stewardship*.

A OMS também, preocupada com o impacto mundial, vem implantando medidas para combater a Resistência Antimicrobiana. O evento muito importante foi a 68ª Assembleia Mundial da Saúde, em maio de 2015, onde a OMS apresentou 5 objetivos fundamentais, necessários para o combate a resistência antimicrobiana. Dentre eles estava otimizar o uso de antimicrobianos e desenvolver abordagens sustentáveis para o desenvolvimento de novos medicamentos e ferramentas diagnósticas (WHO, 2015).

Esta nova atualização dos objetivos também enfatizou o envolvimento multissetorial, onde diferentes setores, tais como a medicina humana, medicina veterinária, pesquisa, pecuária, educação e comunicação, pudessem se interlaçar em busca de uma solução para a RAM (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

Uma equipe multidisciplinar composta por médicos, enfermeiros, microbiologistas, médicos infectologistas, farmacêuticos clínicos e especialistas em controle de infecção pode tornar a administração antimicrobiana em uma meta alcançável (HUGHES, MOORE, 2019). Estes profissionais são o alicerce do programa e fornecem resultados sobre práticas de prescrição, uso de antimicrobianos, incidentes de segurança de medicamentos, padrões locais de resistência antimicrobiana, infecções relacionadas ou complicadas com resistência antimicrobiana e mudanças nas políticas e diretrizes nacionais, novas opções terapêuticas e intervenções diagnósticas inovadoras (HUGHES, MOORE, 2019).



Para um “*Antimicrobial Stewardship*” ter sucesso é necessário que a alta direção institucional se comprometa a apoiar uma equipe multiprofissional, com recursos orçamentários e de tecnologia (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020).

A Figura 17 demonstra nove abordagens fundamentais para o melhor desempenho do gerenciamento do antimicrobiano, tais como: o melhoramento da prevenção e o controle de infecções, controlando da fonte de infecção, prescrever antibióticos quando eles realmente são necessários, prescrever antibiótico com dosagens adequadas, usar a menor duração de antibióticos com base em evidências, reavaliar os resultados da cultura, apoiar a vigilância de resistência antimicrobiana e infecções associadas a saúde, monitorar o consumo dos antibióticos, educar equipe, capacitando-os sobre todos os materiais necessários para o entendimento em RAM e o mais importante o apoio interdisciplinar. (ANWARUL, MAJUMDER, *et al.*, 2020).

**Figura 17 - Elementos Centrais para Gerenciamento de antibióticos.**



**Fonte: Adaptada de Majumder, Rahman, *et al.* (2020).**

Um resultado de amostra clínica rápida propicia várias formas de aceleração do diagnóstico e salva vidas (BOUZA, MUÑOZ, *et al.*, 2018). Neste

contexto, ter um método diagnóstico de identificação de resistência bacteriana rápido, auxilia na redução da RAM e prova que o trabalho multiprofissional é fundamental para o sucesso do “Antimicrobial Stewardship” (MAJUMDER, RAHMAN, *et al.*, 2020).

## 2.7 Espectroscopia Raman

Toda a matéria interage com a luz de diferentes formas, podendo desta maneira a determinar a composição e a constituição da mesma (SALA, 2008). A espectroscopia é utilizada para identificação e caracterização de moléculas, sendo elas de compostos orgânicos ou inorgânicos. (FARIA, AFONSO, *et al.*, 2002, SANTOS, MENEZES, *et al.*, 2019).

A espectroscopia é fundamentada na propriedade do átomo e da molécula de absorver ou emitir energia, produzindo um espectro eletromagnético. Para que as moléculas absorvam ou emitam energia é necessário incidir radiação sobre ela, que resultará em informações sobre as vibrações intra e intermoleculares, o que permitirá a identificação da estrutura química do material analisado (FARIA, AFONSO, *et al.*, 2002, SANTOS, MENEZES, *et al.*, 2019).

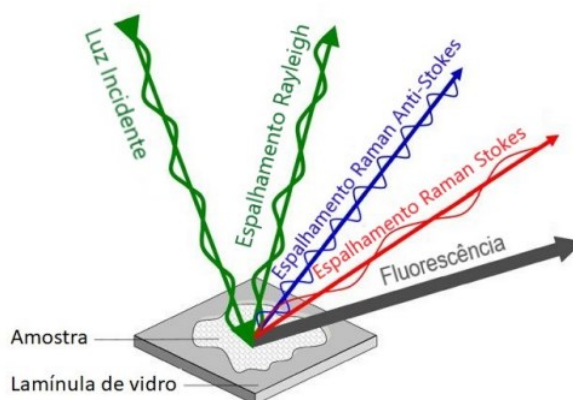
As transições vibracionais são estudadas por meio da espectroscopia vibracional que abrange alguns tipos de técnicas analíticas, tais como: a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia Raman (espalhamento Raman) e a espectroscopia de espalhamento de nêutrons, entre outras. Essas técnicas medem os níveis de energia que vibram as ligações químicas das moléculas, através da interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos átomos constituintes. Este fenômeno gera um espectro vibracional, o qual apresenta detalhes únicos, sinais específicos de cada material e de cada molécula, sendo nomeados de *fingerprint* (SALA, 2008), uma espécie de impressão digital da molécula.

A espectroscopia Raman ou espalhamento Raman é constituída de um espalhamento de fótons que apresenta uma frequência diferente da incidida no composto a ser analisado, conforme esquema da Figura 18. Ao incidir luz em uma amostra e coletar a luz espalhada, é possível verificar o espalhamento

*Rayleigh* (elástico), aquele que espalha radiação com a mesma frequência da luz incidente e os espalhamentos de menor intensidade, que são inelásticos (*stokes* e *anti-stokes*), gerando radiação de frequência diferente da incidente, que ocorrem quando uma onda eletromagnética interage com as cargas elétricas da molécula, produzindo uma vibração específica (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016, MACHADO, 2021, SALA, 2008).

O resultado das vibrações, provocadas pela estimulação das moléculas polarizáveis, gera uma medição qualitativa e quantitativa da composição bioquímica do analito. A espectroscopia Raman tem uma alta especificidade molecular, tornando-se uma excelente técnica para análise de materiais, por esta razão é possível a identificação de moléculas únicas (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016).

**Figura 18 - Esquema identificando os espalhamentos de luz em uma amostra iluminada.**



**Fonte: Machado (2021).**

O espalhamento Raman foi inicialmente observado por Smekal em 1923. Porém, somente após cinco anos foi comprovado, por Raman e Krishnan na Índia e Landsberg e Mandelstam na Rússia. Esta descoberta rendeu em 1930, o Prêmio Nobel aos Raman e Krishnan. Desde a fabricação do primeiro Espectrômetro Raman comercial em 1953, diversos compostos foram possíveis de serem identificados por esta técnica. Entretanto, devido ao uso de fontes de irradiação, dificultava a aplicação e reprodutibilidade dos experimentos (MITSUTAKE, POPPI, *et al.*, 2019).

Com o advento do *Laser* em 1960, o espectrômetro se tornou mais rápido e fácil de ser reproduzido, tanto que Delhay e Migeon em 1966, sugeriram que o espalhamento Raman, independente do volume da amostra, poderia ser aplicado para análise de partículas microscópicas. Desta forma, os primeiros micro espectrômetros Raman foram desenvolvidos e comercializados, a partir de 1974, proporcionando informações espectrais com qualidade de resultado em várias matrizes. As imagens espectroscópicas permitem avaliar a distribuição espacial dos compostos, com base nos espectros gerados, item fundamental para a caracterização das propriedades químicas e/ou físicas da matriz analisada (MITSUTAKE, POPPI, *et al.*, 2019).

O espalhamento Raman envolve uma transição entre um estado eletrônico e um estado virtual de maior energia, porém com energia abaixo do estado eletrônico, excitado subsequente, ocorre o retorno para o estado eletrônico emitindo um fóton de energia menor que o inicial. Este espalhamento de luz leva a uma perda ou ganho de energia pelo fóton através da excitação de modos vibracionais da molécula. A energia de um fóton é calculada levando em consideração que  $h$  é a constante de Planck e  $c$  a velocidade da luz no vácuo sendo proporcional à frequência  $\nu$ , como ilustrado na equação abaixo:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

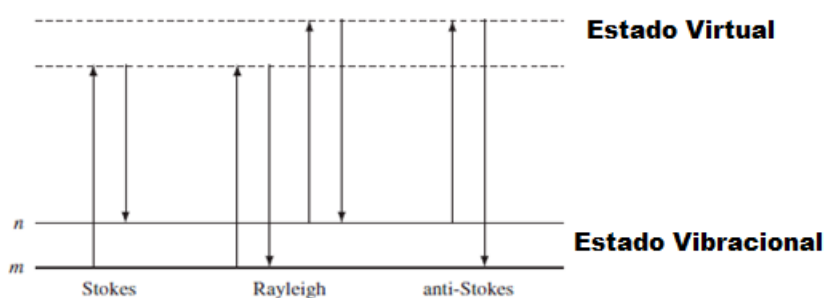
A diferença entre a energia do fóton absorvida e emitida corresponde à diferença de energia entre dois estados ressonantes do material e é independente da energia absoluta do fóton.

A energia da radiação inelasticamente espalhada pode ser maior ou menor que a energia incidente (espalhamento *anti-Stokes* e *Stokes*, respectivamente) e essa diferença é igual à transição vibracional da molécula. Caso as energias incidente e espalhada tenham os mesmos valores, o espalhamento será elástico (espalhamento *Rayleigh*) onde nenhuma informação vibracional molecular é obtida (MACHADO, 2021, SMITH, Ewen, DENT, 2005).

Para o espalhamento *Stokes*, a molécula no estado vibracional  $m$  absorve energia e é promovida para um estado vibracional excitado de alta

energia  $n$  (fótons espalhados tem menos energia que os fótons incidentes:  $h\nu_n \rightarrow h(\nu_n - \nu_m)$ , ou seja,  $\lambda_{antes} < \lambda_{depois}$ . O processo contrário, denominado *anti-Stokes*, diz respeito a transferência de energia para o fóton espalhado. Devido à energia térmica, algumas moléculas podem estar presentes em um estado excitado como  $n$  e retornam para um estado fundamental  $m$  (fótons espalhados tem mais energia que os fótons incidentes:  $h\nu_n \rightarrow h(\nu_n + \nu_m)$ , ou seja  $\lambda_{antes} > \lambda_{depois}$ , como ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Ilustração do espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Anti-Stokes



Fonte: Adaptada de Smith, Dent (2005).

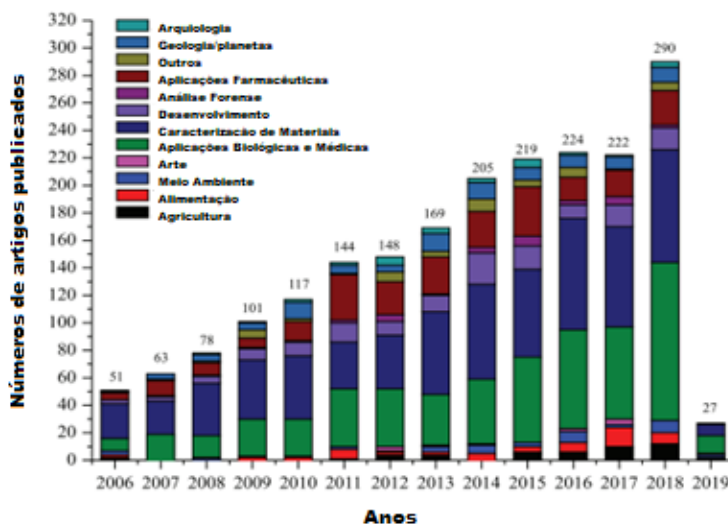
A técnica da espectroscopia Raman exprime um método de análise com um alto grau de flexibilidade, permitindo que os dados sejam registrados de uma gama diversificada de tipos de materiais orgânicos e inorgânicos. A aplicação da micro espectroscopia Raman para a caracterização de materiais biológicos tem sido grandemente utilizada, com ênfase na área da farmacologia, microbiologia, toxicologia, biologia humana e vegetal (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016, MACHADO, 2021, THALER, 2020).

Com o uso da micro espectroscopia foram possíveis detectar regiões significativas do espectro Raman em matrizes biológicas, tais como: vibrações de ligação de proteínas encontradas entre  $1500$  a  $1700\text{cm}^{-1}$ , de carboidratos entre  $470$  a  $1200\text{cm}^{-1}$ , grupos fosfato de DNA entre  $980$  a  $1240\text{cm}^{-1}$ , como também vibrações de ligação de alta frequência associado ao estiramento de CH, NH e OH em lipídios e proteínas entre  $2.700$  a  $3500\text{cm}^{-1}$  (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016).

A utilidade da técnica tem se apresentado muito promissora em diversas áreas. Numa busca bibliográfica realizada entre os anos de 2006 à janeiro de

2019 foram encontradas 1785 publicações as quais apresentavam a utilização da espectroscopia Raman (MITSUTAKE, POPPI, *et al.*, 2019) conforme se pode observar no Gráfico 1.

**Gráfico 1 - Publicações relativas à técnica de Espectroscopia Raman.**



Fonte: Adaptada de Mitsutake, Poppi, *et al.* (2019).

Ao observar o gráfico, é notório o aumento significativo no número de trabalhos acadêmicos ao longo dos anos, para o uso da espectroscopia Raman na área biológica e aplicações na saúde. Uma das áreas da saúde que mais cresceu foi a da oncologia, com o propósito de identificar neoplasias cerebrais, mamárias, vesicais, colorretais, sistema respiratório superior e inferior e em diversas outras estruturas corporais (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016). Também foi observada na aplicação da identificação de doenças infecciosas como a malária (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016). Atualmente, percebe-se o acréscimo em publicações com o objetivo de identificar microrganismos resistentes e a degradação dos antibióticos (MARANGONI, MACHADO, *et al.*, 2022).

O aumento, nos últimos anos, no uso técnica Raman é principalmente devido a sua aplicação em analisar composto em baixas concentrações com um rápido poder de identificação e melhor resolução de imagem (MITSUTAKE, POPPI, *et al.*, 2019).

### 2.7.1 Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície

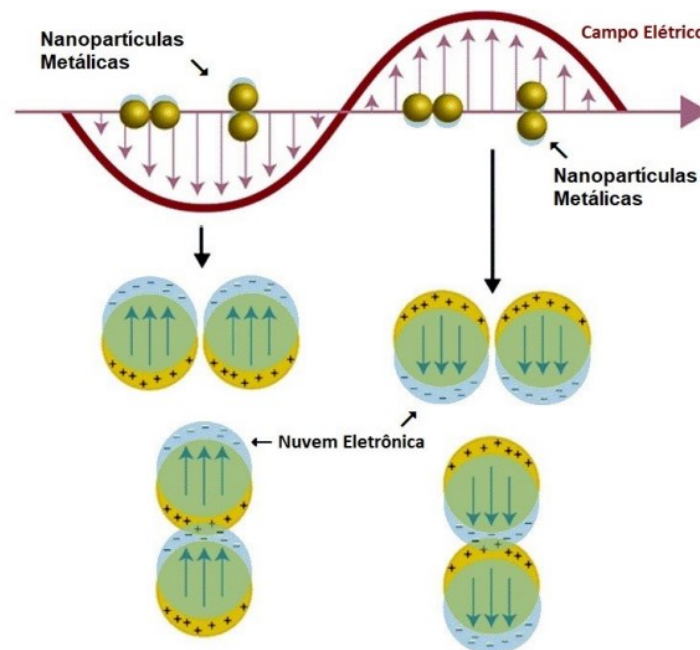
Entende-se que espectroscopia Raman é uma técnica que consiste em iluminar o material a ser analisado e detectar a luz espalhada, sendo que esta luz contém informações específicas sobre os constituintes moleculares que compõem a amostra e que parte desta energia incidente excita vibrações moleculares que aparecem na forma de picos no espectro da luz espalhada, a qual forma uma impressão digital do material (BUTLER, ASHTON, *et al.*, 2016, MACHADO, 2021, SALA, 2008, SMITH, Ewen, DENT, 2005). É imprescindível entender que os efeitos relacionados a este espalhamento da luz, formam sinais Raman com baixa intensidade, dependendo da matriz do analito (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, KNEIPP, KNEIPP, *et al.*, 2006).

Com o objetivo de ampliar estes sinais, nanoestruturas como nanopartículas, precisam ser empregadas. Quando um material (analito) se encontra adsorvido nas vizinhanças de nanoestruturas, ocorrem interações como as de transferência de cargas (um efeito químico) e também um significativo aumento de campo elétrico (um efeito físico, dito plasmônico), este mais acentuado na presença de nanoestruturas metálicas (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, KNEIPP, KNEIPP, *et al.*, 2006). O efeito gerado com o uso destas nanopartículas é conhecido como SERS (*Surface-enhanced Raman Spectroscopy*), que pode ser traduzido por Espalhamento Raman Intensificado por Superfície ao qual amplifica o sinal Raman por fatores de  $10^{12}$  (u.a) (KNEIPP e KNEIPP, *et al.*, 2006, LIU, Chia Ying, HAN, *et al.*, 2016).

O espalhamento Raman intensificado pela superfície (SERS) foi observado pela primeira vez por Fleischmann e colaboradores, em 1974, que relataram um sinal Raman aumentado para a piridina adsorvida de um eletrodo de prata (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, MCNAY, EUSTACE, *et al.*, 2011).

A amplificação do sinal Raman é um fenômeno ótico conhecido como Ressonância de Plásmons de Superfície Localizados (LSPR - *Localized Surface Plasmon Resonance*), efeito oriundo da interação de um campo eletromagnético (luz) com uma nuvem de elétrons presente nas superfícies de nanopartículas metálicas, conforme esquematizado na Figura 20 (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017, MACHADO, 2021).

Figura 20 - Ilustração da ressonância de plásmon na superfície



Fonte: Machado (2021).

Para que haja efeito SERS, dois mecanismos para a ampliação do espalhamento Raman acontecem: um efeito eletromagnético (físico) - que acontece devido à interação dos modos de oscilação de plásmons de superfície (LSPR), onde este processo amplifica a luz incidente, criando um campo eletromagnético intensificado, formando assim *hotspots*, ou seja, regiões com alto efeito de Ressonância Plasmônica (BORA, 2018, THALER, 2020) e outro mecanismo químico que ocorre através da transferência de carga entre o analito e os nanoestruturas utilizadas para amplificação do sinal Raman (MACHADO, 2021).

A técnica SERS combina as vantagens intrínsecas do Raman nas capacidades de reconhecimento, devido às impressões digitais vibracionais das moléculas; análise não destrutiva; preparação mínima da amostra necessária; possibilidade de realizar medições em fluidos biológicos, uma vez que o espectro da água é bastante fraco; detecção simultânea de diferentes analitos (multiplexação); possibilidade de realização de análises in loco com instrumentos portáteis; alta sensibilidade como a detecção de molécula única (PILOT, SIGNORINI, *et al.*, 2019).

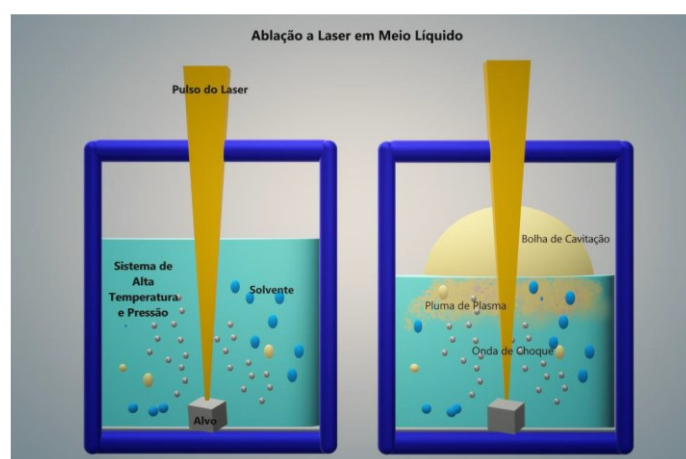


O potencial da espectroscopia SERS apresenta-se, portanto, como um ponto de partida altamente promissor na ciência e na tecnologia, com implicações evidentes no campo da nanomedicina e na área da saúde, inclusive para o monitoramento de medicamentos, dado o potencial de rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica Raman (KNEIPP e KNEIPP, *et al.*, 2006, LIU, Chia Ying *et al.*, 2016).

## 2.8 Ablação a laser em meio líquido

A ablação a laser em solução (LASiS – Laser Ablation Synthesis in Solution) também denominada de ablação a laser em líquido (LAL – Laser Ablation in Liquid) é uma técnica de síntese de nanopartículas amplamente utilizada por pesquisadores (AMENDOLA e MENEGHETTI, 2009, 2013; YAN e CHRISEY, 2012; BARCIKOWSKI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017; FAZIO *et al.*, 2020) que, por meio de um processo de “vaporização”, ejeta o material da superfície de um alvo sólido (bulk), quando imerso em um solvente, através do uso de um laser pulsado e focalizado (MACHADO, 2021; SANTOS, 2022), conforme Figura 21.

**Figura 21 - Técnica de Ablação a laser em meio Líquido.**



Fonte: Santos (2022)

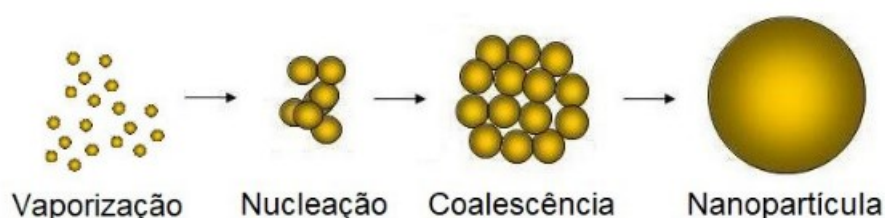
A produção das nanopartículas em meio líquido via LASiS é influenciada por alguns mecanismos físico-químicos e pelos parâmetros do laser utilizado, tais como o comprimento de onda, a energia do pulso e a taxa de repetição (BARCIKOWSKI *et al.*, 2016; MACHADO, 2021; SANTOS, 2022). A interação

entre o laser e o material do alvo durante a ablação também depende de fatores como a composição do solvente, a morfologia do alvo, a fluência e duração do pulso do laser, além da focalização sobre a superfície do material (FAZIO et al., 2020, MACHADO,2021; SANTOS, 2022).

Para utilizar a água como meio líquido, alguns comprimentos de onda como o 532 nm e o 1064 nm são indicados, pois a água é praticamente transparente e ajuda na focalização do alvo na região do visível e do infravermelho (MACHADO,2021).

Quando o feixe focalizado do laser atinge a superfície do alvo metálico, devido à alta densidade de fótons, ocorrem processos de absorção lineares e não-lineares ocasionando a fotoionização do material. Após esse período de tempo, que pode variar de  $10^{-12}$  a  $10^{-4}$  acontece a formação das NPs em meio ao solvente em um processo que pode ser ilustrado em quatro etapas (Figura 22): a vaporização do material logo após a fotoionização, seguido da nucleação que ocorre com o colapso da bolha de cavitação e o resfriamento da pluma, da coalescência através do crescimento dos núcleos e por fim a formação completa das nanopartículas (AMENDOLA e MENEGHETTI, 2009, MACHADO,2021).

**Figura 22 - Ilustração do processo de formação das nanopartículas.**



**Fonte: Machado (2021).**

A estabilidade das suspensões de NPs produzidas depende fortemente da natureza físico-química do líquido escolhido. No caso da síntese em meio aquoso, a estabilização da NPs se dá através da presença de uma fina camada de óxido formada durante o processo de ablação, resultando em uma superfície carregada eletrostaticamente cabe ressaltar que a escolha do solvente influencia também no potencial de aplicação das nanopartículas, principalmente numa aplicação biológica, pois não se pode usar um solvente tóxico (BARCIKOWSKI et al., 2016; MACHADO, 2021; SANTOS, 2022).

## 2.9 Técnicas de Caracterização

As técnicas de caracterização utilizadas na análise dos coloides sintetizados via LASiS, são técnicas experimentais que possuem o objetivo de investigar as propriedades ópticas das nanopartículas tais como tamanho e forma.

### 2.9.1 Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica utilizada para obter os espectros de absorvância, ou seja, a fração luminosa que é absorvida por um determinado material, sendo assim, o UV-Vis mede o comprimento de onda da nanopartícula produzida, quanto a sua possibilidade de absorver e espalhar a luz. A região de energia do espectro eletromagnético da análise varia entre uma faixa de 200 e 1100 nm. (ROUESSAC e ROUESSAC, 2007; MACHADO, 2021; SANTOS, 2022).

### 2.9.2 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – Dynamic Light Scattering) é uma técnica de caracterização que permite medir, de forma rápida e rotineira, não só a distribuição dos tamanhos médios, mas também o formato preliminar das nanopartículas em suspensão (CHU, 2007). Um dos princípios fundamentais da técnica DLS é o espalhamento Rayleigh no qual a luz é espalhada para todas as direções ao atingir uma partícula muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente (BORN e WOLF, 1964; MACHADO, 2021; SANTOS, 2022). Com a técnica DLS é possível detectar partículas em uma larga faixa de tamanhos (entre 0,8 e 6.500nm) (PLAUTZ, 2016)

### 2.9.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM – Transmission Electron Microscopy) é uma técnica fundamental para a caracterização de estruturas nanométricas, ao qual consiste em possibilitar a capacidade de formar imagens de arranjos atômicos em regiões localizadas dentro dos materiais. O

funcionamento consiste no feixe de elétrons que interage com a amostra suficientemente fina à medida que a atravessa. A amostra é disposta entre a fonte de elétrons e um anteparo, onde a imagem ampliada é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados (PADILHA e AMBROZIO, 1986; MACHADO,2021; SANTOS,2022). Desta forma visualizando a morfologia das nanopartículas.



### 3.2 Preparação dos Antibióticos

Os antibióticos foram adquiridos em estado puro, todos da fabricante *Sigma Aldrich*. As amostras utilizadas foram em forma de pó e, num primeiro momento, estes sólidos foram utilizados para a realização dos experimentos a fim de obter os espectros Raman correspondentes. Algumas informações técnicas dos antibióticos estão descritas na Tabela 1, a seguir:

**Tabela 1- Relação Técnica dos Antibióticos.**

Antimicrobianos	Código	Lote	Peso ou Massa molecular (g/mol). (certificado de análise)
Ampicilina	A0166	089M4784V	371,39
Ceftazidima	C3809-1G	019M4859V	546,58
Meropenem	Y0001252	-	437,51

Devido aos antibióticos de uso clínico possuírem adjuvantes a sua fórmula química, optou-se por esta por usar apenas os cristais puros, com o intuito de garantir os espectros de referência correspondente.

Na Tabela 2 são elencados os valores de aquisição dos sais via *Sigma-Aldrich*. Contudo, os mesmos foram doados pelo Instituto Pelé Pequeno Príncipe, devido a uma parceria de pesquisa com o Grupo de pesquisa FOTONANO BIO da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

**Tabela 2- Custos dos Antibióticos Puros<sup>5</sup>.**

Antimicrobianos	Código	Lote	Quantidade (g)	Valor (R\$)
Ampicilina	A0166	089M4784V	1	62,80
Ceftazidima	C3809-1G	019M4859V	1	1.418,00
Meropenem	Y0001252	-	1	10.418,18

Duas porções dos antibióticos puros foram preparadas para a análise. A 1ª amostra (P1) foi preparada com 1mg (miligrama) de pó puro de cada antibiótico numa lâmina de vidro. Para a 2ª amostra (P2) foi preparada com 1mg

<sup>5</sup> Cotação realizada dia 10/08/2022 via internet. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>

de pó puro de cada ATB e adicionado 1ml (mililitro) de água ultrapura (concentração Molar = 2.693 mM) num micro tubo tipo Eppendorf e posteriormente a esta diluição, gotejado 1µl (microlitro) numa lâmina, sendo este procedimento suficiente para captar os espectros Raman. Nesta parte do experimento devido ao custo dos antibióticos, relatado na tabela 2, optamos por somente utilizar ampicilina.

Após esta primeira diluição, uma nova diluição a partir da amostra P2 foi realizada, sendo 1/1000 vezes, ou seja, para cada 1µl da solução P2 foram adicionados 1000 µl de água ultrapura no Eppendorf, (Concentração Molar = 2,6903 mM) formando assim a amostra P3. Esta nova diluição P3 passou a ter condições experimentais imperceptíveis para o Raman, mas condições ideais para análise de espectros SERS.

### 3.3 Preparo da Solução Bacteriana

Nesta metodologia tivemos como apoio e parceria a FIOCRUZ-PR<sup>6</sup>, e em todos os experimentos ao qual possuíam bactérias vivas, utilizamos os protocolos de segurança da instituição, com uso da sala de cultivo de bactérias e o fluxo laminar. Neste experimento somente a ampicilina foi utilizada.

Foram utilizadas a cepa padrão de *Escherichia coli*, para amostra resistente e sensível ao antimicrobiano. Para incubação das cepas e garantir que as bactérias sejam resistentes e sensíveis, foi utilizado 1 ml de Ampicilina, com concentração de 25 mg/ml, em 100 ml de meio LB (Luria Bertani)(A). Em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 10ml da solução de ampicilina, foram inoculadas colônias da cepa padrão de *E. coli* sensível(BS+LBA) e resistente (BR+LBA) (B). Ao final deste procedimento incubou-se por 24h, a 37°C e com 200 rpm no “shaker” (C).

Após esse tempo retirou-se os frascos das culturas do shaker e o meio foi transferido para tubos Falcon de 15 ml para centrifugação (10.000g por 5 minutos) (D). Ao final o sobrenadante foi descartado por inversão e as bactérias

---

<sup>6</sup> Procedimento orientado e supervisionado pelo Drº Leonardo Foti.

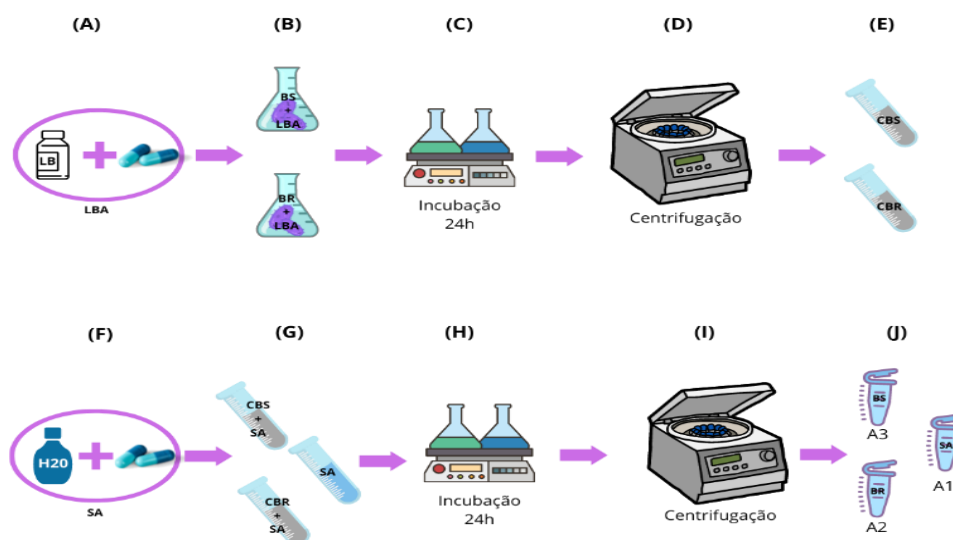
formaram um pellet, sendo um meio de cultura com bactérias sensíveis (CBS) e outro meio com bactérias resistentes (CBR) (E)

Para a suspensão das bactérias cultivadas foi preparado uma nova solução de antibiótico, porém agora, numa porção de 1 ml de ampicilina, de concentração 25 mg/ml, em 100 ml de água ultrapura. Assumindo uma concentração final de 0,25mg/ml (F). Cada suspensão foi realizada com 10 ml da solução concentração final num tubo de ensaio. (CBS+SA): Meio de cultura com bactérias sensível mais solução de ampicilina de concentração 0,25mg/ml; (CBR +SA) Meio de cultura com bactérias resistente mais solução de ampicilina de concentração 0,25mg/ml e (SA) solução de ampicilina pura na concentração 0,25mg/ml (G).

Todos os tubos foram incubados novamente a 37°C e 200 rpm no shaker em 24h (H). Foram centrifugados novamente (I) e o sobrenadante das soluções A1 (solução de ampicilina pura na concentração 0,25mg/ml), A2 (solução de ampicilina da bactéria resistente) e A3 (solução de ampicilina da bactéria sensível) foram armazenados em freezer de -20°C (J) até o momento da leitura para obtenção dos espectros SERS.

Segue, na Figura 24, uma ilustração do esquema metodológico realizado com as bactérias.

**Figura 24 - Esquema metodológico do experimento com bactérias**



Fonte: A autora (2022).

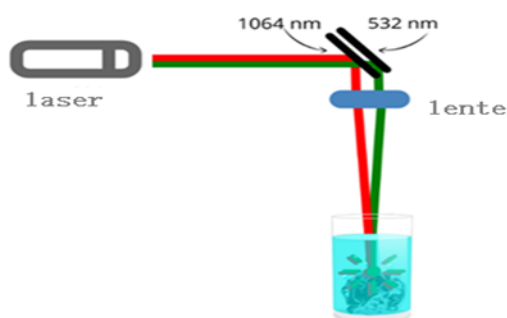


As amostras de ampicilina em contato por 24 horas com a bactéria resistente, com a bactéria sensível e em água pura, foram analisadas utilizando nanopartículas metálicas de bismuto (SbNP) e cobalto (CoNP)<sup>7</sup> para amplificar o sinal do espalhamento Raman (SERS).

### 3.4 Substratos SERS

As nanopartículas (NPs), utilizadas para a obtenção do aumento do espalhamento Raman foram sintetizadas por meio da técnica de ablação a laser em solução, também conhecida por LASiS (*Laser Ablation Synthesis in Solution*), conforme esquema da Figura 25, que consiste na utilização de um alvo metálico imerso em um solvente, no caso água ultrapura (condutividade menor que 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). O alvo é bombardeado com laser modelo Brilliant B, operando nos comprimentos de onda de 1064 nm e 532 nm, Q-switched em 338  $\mu\text{s}$ , entregando pulsos de 5 ns com energia total de 220 mJ (sendo 200 mJ para o vermelho e 20 mJ para o verde).

Figura 25 - Esquematização do experimento.



Fonte: A autora (2022).

O laser opera em pulso único e tem uma incidência de 45° em dois espelhos (para ambos os comprimentos de onda) que refletem em uma lente de distância focal de 30 cm antes de incidir no alvo, com detalhes da técnica

---

<sup>7</sup> NPs produzidas e caracterizadas por Thiago Machado e Juliana Thaler. Descrição das NPs em (MACHADO, 2021, THALER, 2020)

relatados por (MACHADO, 2021), conforme mostrada na representação da Figura 25.

Os alvos metálicos não convencionais utilizados nesse processo foram bismuto (BiNP), cobalto (CoNP), antimônio (SbNP), e alvos metálicos convencionais ouro (Au) e prata (Ag), que foram adquiridos na Sigma-Aldrich com 99% de pureza. Para a preparação do coloide (matriz) foram utilizados béqueres com 15ml de água destilada, de maneira a formar uma coluna de 2cm de água e um pedaço pequeno do metal selecionado por um período de 3 minutos.

No final desse processo, foram obtidas soluções coloidais formadas apenas de nanopartículas metálicas suspensas em água (sem aditivos) que foram caracterizadas quanto a sua absorção óptica (espectrofotometria de UV-Vis) e a sua dispersão de tamanho (espalhamento dinâmico de luz, DLS).

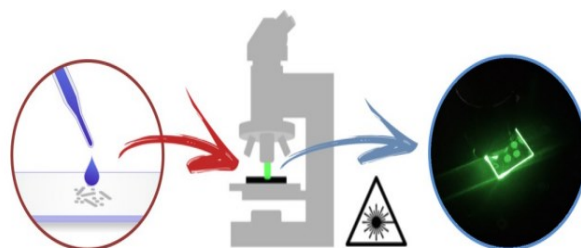
### **3.5 Espectros Raman/SERS**

Os espectros Raman e SERS dos antibióticos, objeto deste estudo, foram obtidos em um microscópio confocal WiTec Raman Alpha 300R, operando com laser de excitação em 532nm (laser verde) maior afinidade com matrizes biológicas e 633nm (laser vermelho), objetiva de 50x, potência de 10 mW e tempo de integração de 10s.

Nos experimentos Raman foram utilizadas amostras P1 (ATB puro em pó) e as amostras P2 e P3 diluídas.

Para a obtenção dos espectros Raman amplificado por nanopartículas (SERS) a técnica batizada de “gota a gota” (BEZERRA, A. G., CAVASSIN, *et al.*, 2017) e relatado por (MACHADO, 2021) foi a escolhida. Esta técnica consiste na mistura entre 1 $\mu$ l da solução contendo a molécula interrogada em uma concentração de 5mM, e 1 $\mu$ l da suspensão de nanopartículas recém preparadas, com uma concentração de 2mg/ml. O esquema experimental é apresentado na Figura 26.

**Figura 26 - Esquema experimental das medidas de espalhamento Raman.**



**Fonte: Machado (2021).**

Os espectros obtidos experimentalmente foram analisados com um programa para análise de gráficos (Origin 2021), a fim de tornar possível a obtenção dos picos vibracionais, conforme pode ser observado na seção de resultados e discussão (Capítulo 4)

### **3.6 Simulação do Espectro Raman**

De modo a estabelecer uma correlação entre os picos experimentais e as vibrações moleculares específicas da Ampicilina, a simulação do espectro Raman foi realizada com o software Gaussian para a molécula no vácuo e conformação otimizada por Hartree-Fock/6-311G (MACHADO, THALER, 2020)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

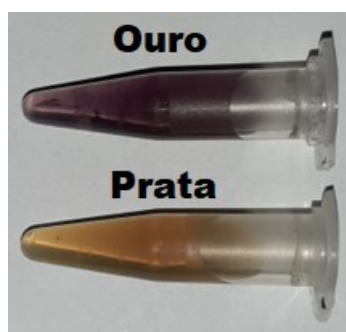
Nessa seção serão apresentados os resultados experimentais, da síntese e caracterização das nanopartículas de metais convencionais (Au e Ag) aos quais foram produzidos para este estudo, espectros de espalhamento Raman dos antibióticos puros e diluídos, espectros de soluções com bactérias sensíveis e resistentes e por fim o resultado do espalhamento Raman com sua amplificação (SERS) com as nanopartículas sintetizadas com metais convencionais e não convencionais. Todos os resultados foram comparados com autores de referência no tema, com o intuito de discutir amplamente os achados experimentais).

### 4.1 Síntese de nanopartículas via ablação a laser

Para a realização dos experimentos, devido à pesquisa ser parte de um projeto maior, no contexto do grupo de pesquisa (FOTONANO BIO), algumas nanopartículas, tais como: Bismuto (BiNP), Cobalto (CoNP) e Antimônio (SbNP) foram produzidas por outros pós-graduandos, particularmente, Thiago Machado e Juliana Thaler. Maiores detalhes das sínteses podem ser consultadas nas produções científicas (dissertações). (MACHADO, 2021, THALER, 2020).

As suspensões coloidais resultantes da síntese das NPs (nanopartículas), a partir dos alvos metálicos de Ouro e Prata, via LASiS, conforme descrito no capítulo anterior, foram obtidas em poucos minutos e apresentaram colorações distintas, conforme pode ser observado na Figura 27.

**Figura 27 - Amostra de suspensões coloidais de nanopartículas de Ouro (Au) e Prata (Ag).**



Fonte: A autora (2022).

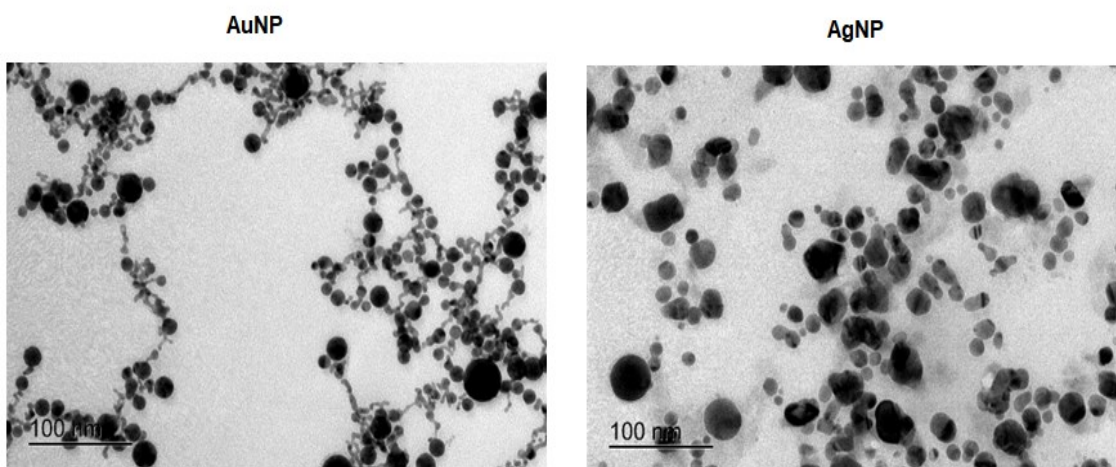
## 4.2 Caracterização Microscopia Eletrônica, DLS e UV-VIS

Todas as NPs (nanopartículas) sintetizadas foram caracterizadas através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e absorção ótica (UV-Vis) imediatamente após a síntese via ablação.

### 4.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Na imagem de microscopia eletrônica das NPs (Figura 28) ficou evidente o formato esférico das NPs, assim como a distribuição dos diâmetros de tamanhos variados, em concordância com trabalhos experimentais (BEZERRA, *et al.*, 2017; RASHIDA, 2017; MACHADO, 2021).

**Figura 28 -TEM das NP de Ouro (AuNP) e Prata (AgNP).**



**Fonte: A autora (2022).**

Todas as NPs foram medidas e seus valores tabulados no programa Excel Na tabela 3, segue tabulação da amostragem de NPs analisada, o maior e menor tamanho, a média aritmética entre elas e o desvio padrão deste cálculo.

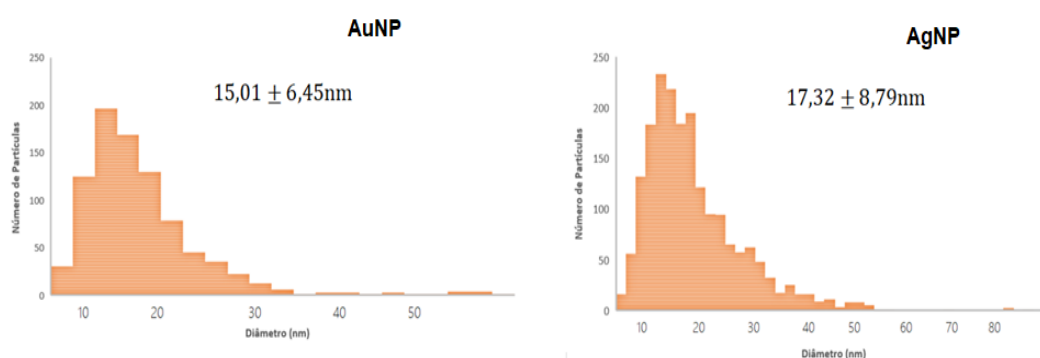
**Tabela 3 – Resultados os Tamanhos da NPs de Au e Ag realizados pelo TEM**

	Amostragem	Maior NP (nm)	Menor NP (nm)	Média (nm)	Desvio Padrão (nm)
<b>AgNPs</b>	1917	80,88	3,59	17,32	8,79
<b>AuNPs</b>	862	54,07	2,27	15,01	6,45

Fonte: A autora (2022).

Segundo Rashida (2017) não existe um parâmetro para o tamanho das nanopartículas, apenas o seu tamanho é importante na determinação das suas aplicações. Mesmo com esta afirmação, a análise de dimensão, verificou-se que o tamanho médio das nanopartículas também correspondem com os trabalhos experimentais (BEZERRA, *et al.*, 2017, MACHADO, 2021), perfazendo uma média de  $15,01 \pm 6,45\text{nm}$  para AuNP e  $17,32 \pm 8,79\text{nm}$  para AgNP, conforme mostrado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - TEM - Tamanho médio das NPs de Au e Ag.

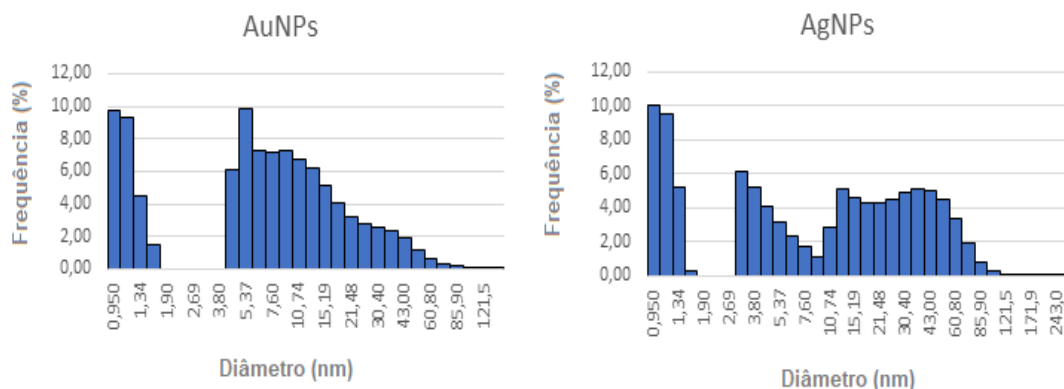


Fonte: A autora (2022).

#### 4.2.2 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

Para determinar a distribuição média dos diâmetros hidrodinâmicos das NPs foi necessária a caracterização por espalhamento dinâmico de luz (DLS). É importante ressaltar que, devido ao processo de síntese por ablação a laser proporcionar uma dificuldade intrínseca no controle de tamanhos das NPs produzidas, existe uma dispersão natural no diâmetro médio. É possível observar no Gráfico 3 que a distribuição dos tamanhos dos diâmetros hidrodinâmicos das NPs apresenta variação.

Gráfico 3 - DLS Tamanho médio das NPs.



Fonte: A autora (2022).

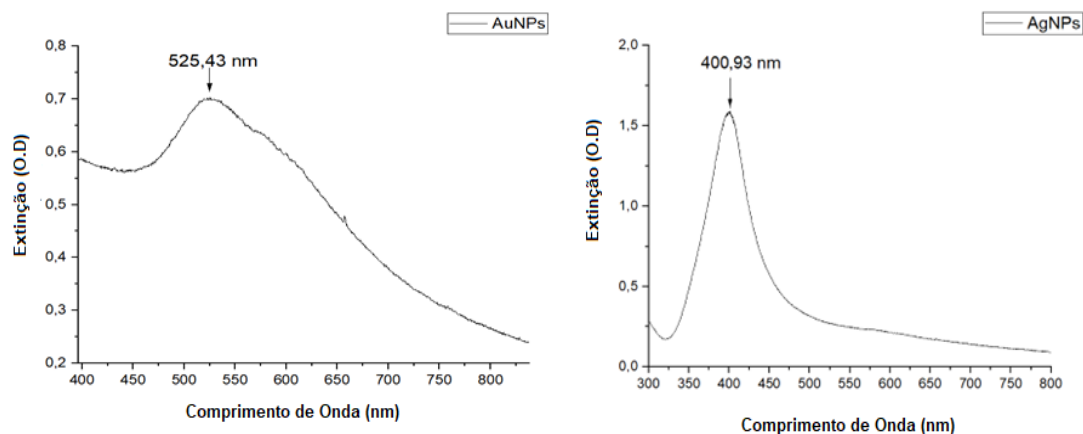
As AuNP variam de 0,9nm a 85,9nm e apresenta um valor médio de  $10,52 \pm 5,4$ nm. As AgNPs variam de 0,9nm a 121,5nm e apresenta um valor médio de  $16,72 \pm 08,93$ nm.

Observa-se que as nanopartículas de ouro e de prata sintetizadas apresentam uma dispersão de tamanho que é compatível àquela obtida quando se realizam sínteses por meio de ablação a laser, o que pode ser verificado nos trabalhos de diversos autores (AMENDOLA e MENEGHETTI, 2009, 2013; YAN e CHRISEY, 2012; BARCIKOWSKI et al., 2016; ZHANG et al., 2017; FAZIO et al., 2020)

#### 4.2.3 Absorção Ótica (UV-Vis)

Todas as NPs sintetizadas foram caracterizadas através da técnica de absorção ótica (UV-Vis) imediatamente após a síntese via ablação. No Gráfico 4 é possível observar que todos os espectros de extinção das NPs são diferentes entre si, porém todos eles apresentam ressonância localizada de plásmom de superfície (LSPR), principalmente na região do visível (400nm a 550nm), em acordo com predições teóricas do trabalho experimental (BEZERRA, et al., 2017).

**Gráfico 4 - UV-vis: densidade óptica (Extinção) x comprimento de onda.**



**Fonte: A autora (2022).**

Nota-se que os espectros apresentados no gráfico 4 são compatíveis com a presença de nanopartículas esféricas. No caso das nanopartículas de ouro, o pico de plásmon centrado em torno 525nm e, no caso das nanopartículas de prata, centrado em torno de 400nm, representam coloides dos elementos puros, conforme se pode verificar em outras referências sobre a produção de coloides (AMENDOLA e MENEGHETTI, 2009, 2013; YAN e CHRISEY, 2012; BARCIKOWSKI et al., 2016; ZHANG et al., 2017; FAZIO et al., 2020).

### 4.3 Espectros Raman de antibióticos em forma de pó

#### 4.3.1 Ampicilina

O espectro do antibiótico ampicilina puro foi realizado, para verificação dos picos. O resultado, apresenta na região de  $1002\text{cm}^{-1}$  um pico correspondente ao anel Benzênico e na região de  $1782\text{cm}^{-1}$  um outro pico relacionado a ligação  $\text{C}=\text{O}$  do anel  $\beta$  – lactâmico (Figura 29), os picos são compatíveis com os encontrados nesta literatura (BARALDI, TINTI, *et al.*, 2014).

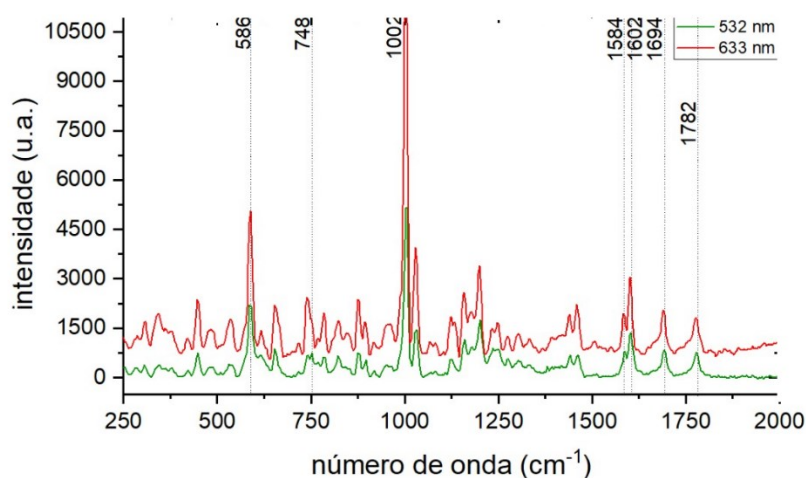
É interessante observar que, no contexto da espectroscopia Raman/SERS, os espectros obtidos sejam dependentes das condições experimentais, como por exemplo, os comprimentos de onda utilizados. Sendo assim, é possível identificar na literatura outros experimentos em que são apresentados espectros da ampicilina (EL-ZAHRY, *et al.* 2015; HAN LEE, *et al.* 2020;), porém, sem que seja possível observar os picos que são descritos no



presente trabalho, particularmente aqueles associados à ligação C=O. Neste sentido, a identificação desta vibração específica pode ser considerada uma contribuição original do presente trabalho de pesquisa.

É importante ressaltar que os picos não estão exatamente no mesmo número de onda, pois, devido aos ajustes matemáticos, pode haver deslocamentos.

**Figura 29 - Espectro Raman da Ampicilina em forma de Pó.**



**Fonte: A autora (2022).**

#### 4.3.2 Ceftazidima

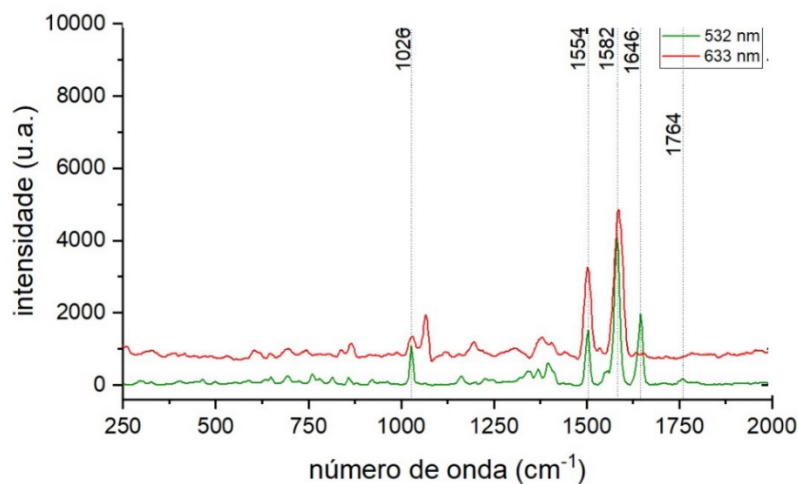
Em busca de identificar a relação entre os espectros, o antibiótico Ceftazidima da subclasse Cefalosporina, ao qual também pertence ao grupo dos  $\beta$  – lactâmicos também foi selecionado. Mais uma vez picos característicos foram evidenciados (Figura 30).

O pico na região  $1086\text{cm}^{-1}$  dá a entender que representa o anel benzênico existente na molécula. Como a mesma possui em sua estrutura um Nitrogênio inserido, é possível que esta adição seja o motivo do descolamento mais acentuado. O pico na região  $1759\text{cm}^{-1}$  apresentar-se com características da ligação C=O do anel  $\beta$  – lactâmico, como não foram encontrados na literatura dados sobre Ceftazidima para comparação, utilizamos como princípio a mesma base da Ampicilina pois o Anel é o mesmo em todos.

Pode-se ressaltar que o fato de não haver referências (espectros Raman/SERS) registradas para este antibiótico específico, demonstra, ao

mesmo tempo, a originalidade do presente trabalho, bem como sua relevância de acrescentar estes dados à literatura.

**Figura 30 - Espectro Raman Ceftazidima em forma de Pó.**

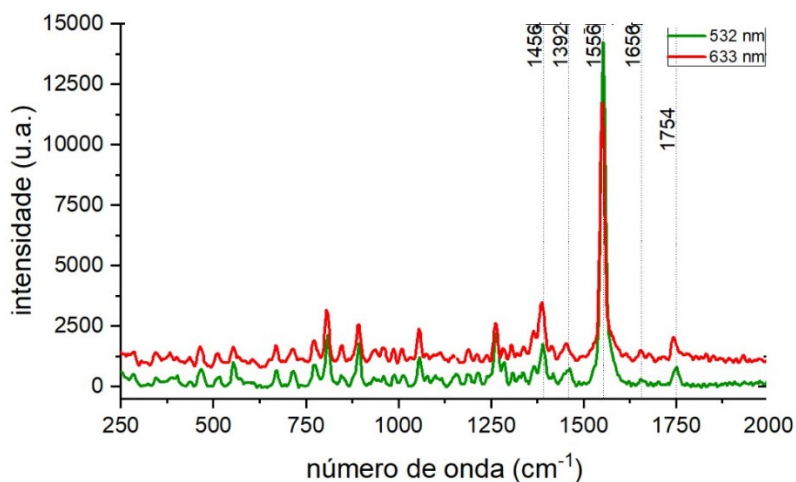


**Fonte: A autora (2022).**

#### 4.3.3 Meropenem

O Meropenem é antibiótico mais utilizado na assistência hospitalar em quadros de pacientes em estado grave. Por este motivo a escolha deste para avaliação do espectro Raman. Uma molécula muito diferente da ampicilina e da Ceftazidima, contudo com o anel  $\beta$  – lactâmico em comum. Nos resultados foi possível a identificação da ligação C=O do anel (Figura 31).

**Figura 31 - Espectro Raman do Meropenem em forma de Pó.**



**Fonte: A autora (2022).**

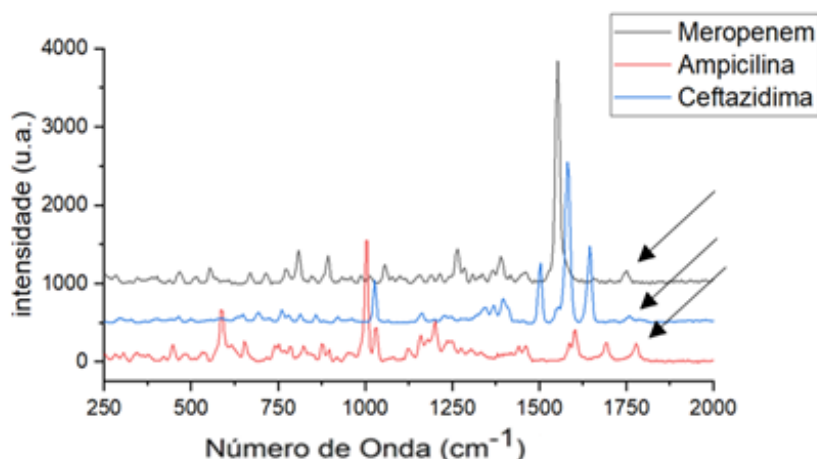
Em literatura existente, o resultado encontrado foi compatível com a vibração da ligação C=O (CIELECKA-PIONTEK, PACZKOWSKA, *et al.*, 2013).

Da mesma forma que os achados anteriores, ressalta - se que o fato de não haver outras referências (espectros Raman/SERS) registradas para este antibiótico específico, demonstra, ao mesmo tempo, presente trabalho, bem como sua relevância de acrescentar estes dados à literatura

#### 4.3.4 Comparação dos $\beta$ – lactâmicos estudados

Comparando os três  $\beta$  – lactâmicos, como mostra a Figura 32, é evidente a correlação dos fármacos, o que era esperado, visto que são da mesma classe. Algumas vibrações correspondentes ao anel  $\beta$  – lactâmico foram encontradas, contudo o achado mais importante para o estudo, é a identificação do pico na região compreendida entre  $1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1800\text{ cm}^{-1}$ , que se refere a ligação química C=O.

Figura 32 - Espectros Raman de Antibióticos  $\beta$  – lactâmicos.



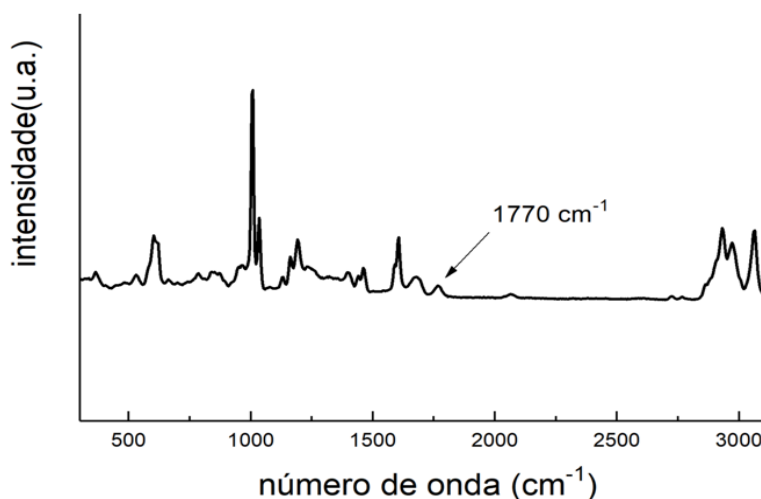
Fonte: A autora (2022).

#### 4.4 Espectroscopia Raman de antibióticos em forma de solução

Na sequência, optou-se em somente utilizar um único  $\beta$  – lactâmico (ampicilina), visto que nos resultados anteriores já foi possível a comparação das três subclasses, as quais apresentaram correspondência. O intuito era realizar

uma prova de conceito Raman com o antibiótico diluído em água (amostra P2), conforme Figura 33

**Figura 33 - Espectro Raman da amostra P2 de Ampicilina.**



**Fonte: A autora (2022).**

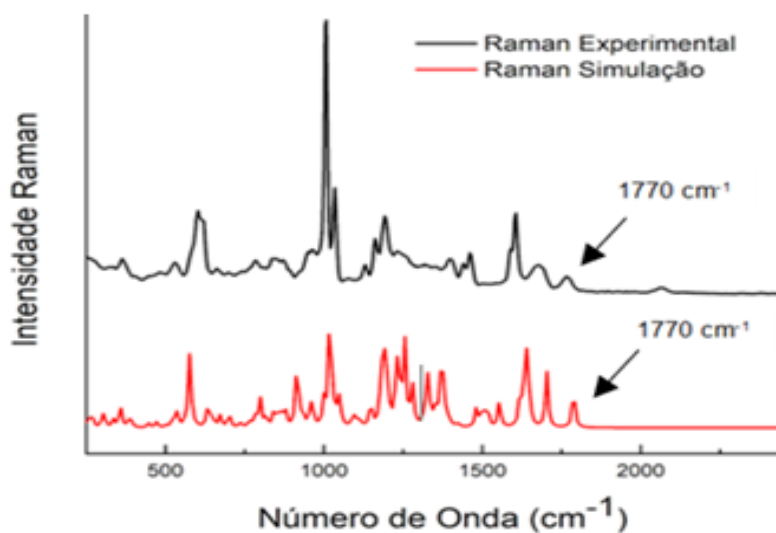
Com a realização dos espectros, as mesmas vibrações correspondentes encontradas no só puro foram encontradas, principalmente as relacionadas ao anel  $\beta$  – lactâmico, ao que se refere a ligação química C=O que se encontrou na região de  $1770\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.5 Simulação de Espectros Raman da molécula Ampicilina intacta**

Com o objetivo de confirmar que os espectros preliminares estavam coerentes, foi realizado uma simulação computacional da Ampicilina intacta para enfim, comparar com a leitura obtida no Raman, cuja finalidade é de identificar as vibrações moleculares da Ampicilina, mais especificamente aquelas que representam as vibrações do anel  $\beta$  – lactâmico, visto que a literatura não apresenta todas as comparações as quais foram identificadas, demonstrando novamente a originalidade do presente trabalho.

O Espectro de simulação computacional observou-se que, qualitativamente, os espectros Raman são semelhantes e possuem correspondência entre as vibrações. No ensaio computacional realizado identificou-se que o pico correspondente à vibração da ligação C=O do anel  $\beta$  – lactâmico situa-se na região de  $1770\text{cm}^{-1}$ , conforme observa-se na Figura 34.

Figura 34 - Espectros Raman da Ampicilina intacta por simulação computacional e por microscopia Raman



Fonte: A autora (2022).

#### 4.6 Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície de antibióticos em forma de solução

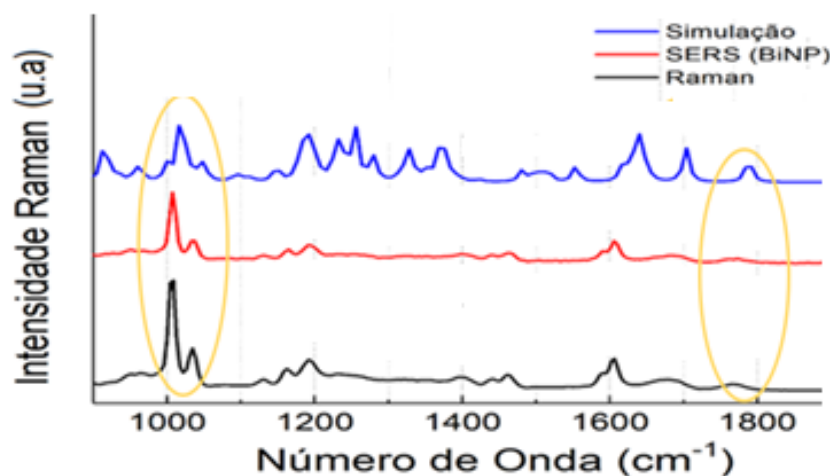
Para este experimento, foi utilizada a solução de Ampicilina muito diluída (Amostra P3 = CM=2,6903mM), com o objetivo de verificar se o espectro SERS manteria a mesma conformação gráfica. Nesta solução P3 não é possível detectar nenhum sinal Raman.

Assim, esta solução super diluída foi realizada com a adição de 1µL de coloide contendo nanopartículas de bismuto (BiNP), a fim de obter o aumento plasmônico, conforme mostrado na Figura 35.

Para facilitar a compreensão entre os espectros na Figura 35 foram demonstrada o resultado do Espectro Raman da Solução P2 com a simulação do espectro Raman da molécula de Ampicilina, já anteriormente apresentada com os picos encontrados na avaliação SERS da solução P3 com o intuito de estabelecer uma associação entre os picos experimentais e as vibrações moleculares específicas do antibiótico.

As vibrações moleculares da Ampicilina que merecem destaque, e que foram verificadas e comprovadas nos resultados da simulação, são aquelas associadas à respiração do anel benzênico, pico próximo a 1000cm<sup>-1</sup>, bem como vibrações presentes na região entre 1600cm<sup>-1</sup> e 1800cm<sup>-1</sup>.

Figura 35 - Espectros da Ampicilina: Raman (Amostra P2), SERS (Amostra P3) com nanopartículas de Bi e simulação



Fonte: A autora (2022).

Após estes experimentos preliminares, ficou evidente que o pico  $1770\text{cm}^{-1}$ , correspondente à ligação C=O que caracteriza o anel  $\beta$  – lactâmico e que mesmo em uma concentração extremamente baixa, é possível com a técnica SERS identificar o antibiótico.

Após esta primeira prova de conceito, e com resultados positivos optou-se em testar solução de antibióticos com bactérias sensível e resistente, com o intuito de identificar uma possível alteração da molécula e conferir que a quebra do anel  $\beta$  – lactâmico acontece na ligação C=O

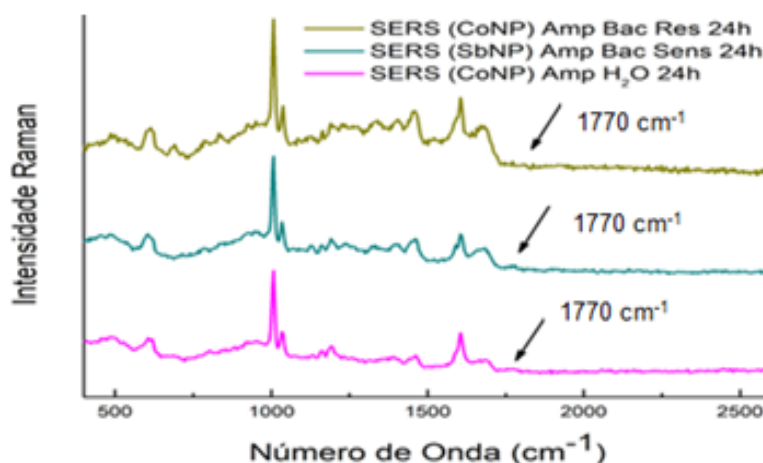
#### 4.7 Espectro SERS em Soluções Bacterianas

Os Espectros experimentais com soluções Bacterianas sensíveis e resistentes foram amplificados com nanopartículas metálicas, de metais não convencionais de bismuto (SbNP) e cobalto (CoNP)<sup>8</sup> e com estas nanopartículas a Figura 36, apresenta, um espectro com pico em  $1770\text{cm}^{-1}$  correspondente a ligação C=O do anel  $\beta$  – lactâmico nas amostras de Ampicilina com água (cor rosa) e com bactérias sensíveis (cor verde escuro), contudo, na amostra com a bactéria resistente (cor verde claro) não é possível a visualização deste pico, ou

<sup>8</sup> NPs produzidas e caracterizadas por Thiago Machado e Juliana Thaler. Descrição das NPs em (MACHADO, 2021, THALER, 2020)

seja, o antibiótico possivelmente foi clivado pela bactéria, significado que o anel  $\beta$  – lactâmico foi aberto, inativando assim sua função bactericida.

**Figura 36 - Espectros SERS do antimicrobiano ampicilina em contato com a bactéria resistente, com a bactéria sensível e com água por 24 horas.**



**Fonte: A autora (2022).**

Este achado corrobora com a nossa intenção de obtenção de espectros SERS para identificação resistência antimicrobiana, provando que existe uma quebra do anel  $\beta$  – lactâmico, fato característico da inibição química do fármaco.

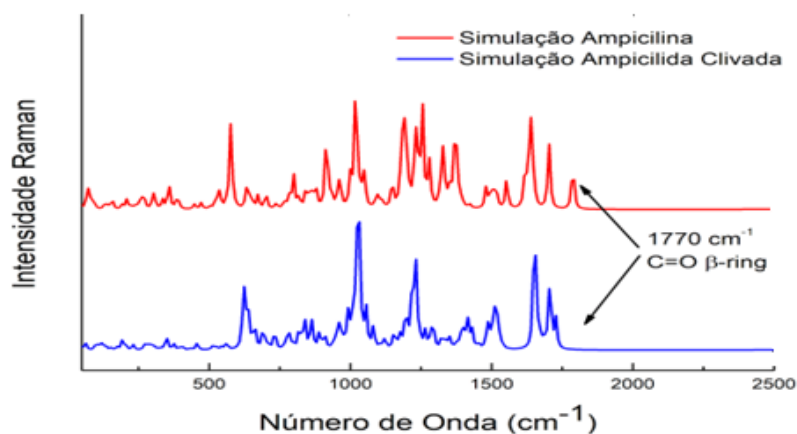
É fundamental ressaltar que, (o pico da vibração C=O) comprova que esta vibração serve de base para investigações associadas à resistência aos  $\beta$  – lactâmicos, particularmente porque o anel  $\beta$  – lactâmico é "quebrado" pela ação de enzimas produzidas por bactérias resistentes.

Volto a ressaltar que o fato de não haver referências (espectros Raman/SERS) registradas para este procedimento de solução de antibiótico com bactérias sensíveis e resistentes, demonstra, a originalidade do presente trabalho, bem como sua relevância de acrescentar estes dados à literatura.

#### **4.8 Simulação de Espectros Raman da molécula Ampicilina com anel Rompido**

A fim de confirmar os achados anterior de clivagem do Anel  $\beta$  – lactâmico por resistência bacteriana, uma nova simulação molecular foi realizada, com a ampicilina intacta e a outra clivada, ou seja, com o anel rompido na ligação C=O. Conforme se apresenta na Figura 37, é notória a perda do pico na região de  $1770\text{cm}^{-1}$ , confirmando o sucesso do experimento na verificação do efeito.

**Figura 37 - Espectros da ampicilina intacta e com o anel rompido obtidos por simulação computacional.**



Fonte: A autora (2022).

#### 4.9 Espectros SERS de Ampicilina com metais convencionais

A literatura sugere que sejam utilizadas nanopartículas de metais nobres convencionais de ouro e prata, para detecção e caracterização de sinais SERS, com o intuito de prova de conceito e reprodutibilidade do experimento (GALVAN, YU, 2018).

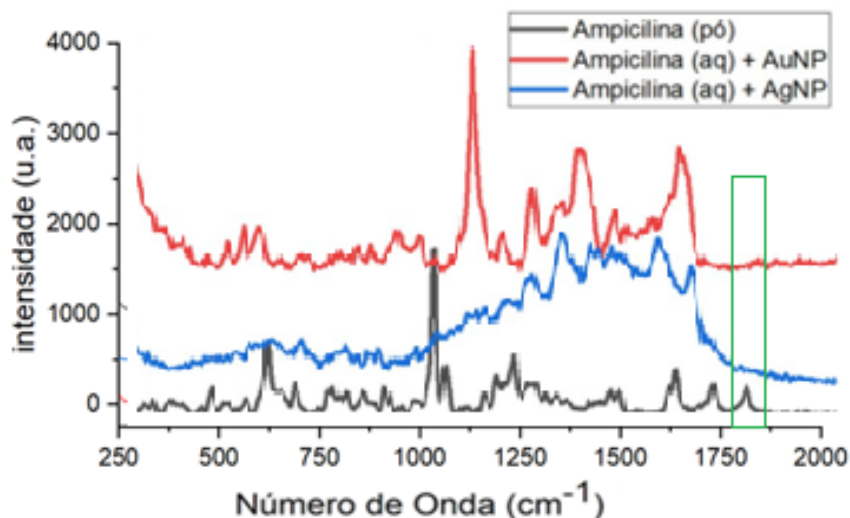
Baseados na indicação da literatura acima supracitada, de realizar experimentos SERS com metais nobres convencionais, Espectros da Ampicilina foram realizados para mitigar esta sugestão.

E para facilitar a comparação entre os Espectros na Figura 38, foram utilizados a análise Raman do Antibiótico em pó e o resultado do Espectro SERS da solução P3 (solução muito diluída  $\text{CM} = 2,6903\text{mM}$ ) com as nanopartículas produzidas e apresentadas nesta pesquisa.

Neste experimento somente o Espectro com a Nanopartícula de Ouro (AuNP) teve picos característicos e semelhantes aos Espectros Raman encontrados neste trabalho e validado por literatura e simulação. O Espectro com a Nanopartícula de Prata (AgNP) apresentou picos distorcidos e sem perfil de comparação. Como pode ser visualizado na Figura 38.



Figura 38 – Espectro SERS da Ampicilina em Pó e em solução P3 associado a Nanopartículas de Ouro (AuNP) e Prata (AgNP)



Fonte: A autora (2022).

Segundo Reus *et al.* (2018) é muito importante considerar o material metálico escolhido como alvo e também a influência direta nas aplicações das NPs (nanopartículas), por exemplo, uma NP com um potencial tóxico como a prata deve ser utilizada com mais cautela do que NPs de bismuto em uma aplicação biológica.

Baseado nesta afirmação da literatura e avaliando o Espectro SERS encontrado é possível que tenha havido algum tipo de interação do analito com a amostra. Entretanto devido a pandemia, outro fator relevante para a não obtenção de espectros compatíveis pode ter sido o fato de o analito ter sido armazenado por muito tempo, e este ter perdido a sua estabilidade. E com o fechamento do Laboratório de microscopia da UFPR (Universidade Federal do Paraná), não foi possível a realização de novos outros experimentos SERS com antibióticos diluídos no momento da análise e com as nanopartículas de ouro e prata produzidas.

## 5 CONCLUSÃO

As IRAS (Infecções Relacionadas a assistência a saúde) são causadas principalmente por bactérias multirresistentes (BMR) aos antibióticos e encontradas especialmente em ambiente hospitalar, devido principalmente ao fato de o paciente estar debilitado e com suas defesas imunológicas baixas, causando assim um aumento da mortalidade de pacientes já vulneráveis.

O atual panorama da falta de novos antibióticos mostra a urgência e a necessidade de entender a ação dos medicamentos existentes por meio de métodos alternativos de identificação de resistências bacterianas. Além disso, as estratégias, para superar tal problema, requerem conhecimento ampliado dos mecanismos moleculares associados à suas origens, evolução e sua distribuição pelas populações bacterianas.

Muitos métodos tradicionais usados em estudos de resistência a antibióticos dependem do cultivo bacteriano e determinação da concentração inibitória mínima (CIM), incluindo contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e monitoramento das curvas de crescimento, combinadas a técnicas moleculares, como por exemplo a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Todavia, essas técnicas de monitoramento tendem a apresentar alto custo e demandam longos tempos até a obtenção dos resultados.

O *Antimicrobial Stewardship* vem justamente trazer a importância deste contexto e principalmente demonstrar que a solução está em uma ligação multidisciplinar, ao qual interlaça a área da ciência da saúde com outras áreas como por exemplo as exatas. Portanto, técnicas alternativas, baseadas em fotônica e nanotecnologia, são apresentadas e comprovadas, podendo ser uma nova alternativa de contribuição nesta ligação multifacetária na luta contra a resistência antimicrobiana, pois apresenta soluções rápidas e de baixo custo.

O objetivo de trabalho foi investigar a aplicação da Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) na detecção de antibióticos. Nesta pesquisa com ênfase nos  $\beta$  – lactâmicos, a maior classe terapêutica para infecções.

O potencial do SERS apresenta-se, portanto, como um ponto de partida altamente promissor na ciência e na tecnologia, com implicações evidentes no

campo da nanomedicina e na área da saúde, inclusive para o monitoramento de medicamentos, dado o potencial de rapidez, sensibilidade e especificidade da técnica Raman.

Os estudos com o uso da técnica vêm crescendo exponencialmente ano a ano, principalmente na área das ciências biológicas, conforme apresentado no Gráfico 1, no capítulo 2, corroborando com o resultado deste estudo, o qual contribui para comprovar que a técnica da Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície pode ser sim uma grande ferramenta para identificação de antibióticos e sua degradação.

Todos os espectros gerados foram contundentes na identificação e caracterização da molécula de antibiótico estudado, indicando a viabilidade da ferramenta no uso biológico. A identificação da ligação C=O do anel  $\beta$  – lactâmico na região entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1800\text{ cm}^{-1}$  para todos os antibióticos estudados demonstrou a correlação entre eles, fato que configurou a originalidade da pesquisa, pelo simples fato de não haver na literatura atual tal relato.

Ressalto que o *Antimicrobial Stewardship*, ou melhor, o programa de Gerenciamento de Antimicrobianos, pode incorporar a ferramenta RAMAN/SERS como uma técnica viável, barata e rápida de identificação e caracterização de antimicrobianos, sendo ele na forma intacta ou degradada.

## 6 SUGESTÃO DE FUTUROS TRABALHOS

Após reconhecer o potencial desta técnica, tenho como proposta para trabalhos futuros a identificação de outras classes antimicrobianas, tais como: glicopeptídeos e aminoglicosídeos, mas principalmente utilizar esta técnica na identificação de antimicrobianos em meios biológicos, como urina, sangue e tecidos, com a criação de uma biblioteca de espectros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. DEC, p. 1–7, 2010. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics, Royal Society of Chemistry (RSC)**, v. 11, n. 20, p. 3805-3821, 2009.
- AMENDOLA, V., MENEGHETTI, M. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? **Physical Chemistry Chemical Physics, Royal Society of Chemistry**, v. 15, n. 9, p.3027-3046, 2013.
- ARRUDA, C. M.; SIQUEIRA, V. F. A.; SOUZA, F. J. M.; et al. Revisão Bibliográfica de Antibióticos Beta-Lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, p. 982–995, 2019.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. 2014. Dissertação de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: [http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG\\_21378.pdf](http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG_21378.pdf).
- BANERJEE, R., TENG, C. B., CUNNINGHAM, S. A., et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 7, p. 1071–1080, 2015. DOI: 10.1093/cid/civ447.
- BARALDI, C.; TINTI, A.; OTTANI, S.; et al. Characterization of polymorphic ampicillin forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 329–340, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.08.021.
- BARBERINO, M. G. M. A. Principais mecanismos de resistência bacteriana. **Phoenix Comunicação Integrada**. Sn, Fev. 2018
- BARCIKOWSKI, S. et al. **Handbook of Laser Synthesis of Colloids**. 150 p. 2016.
- BATISTA, Y. de A., COELHO, J. L. G., ALMEIDA, N. dos S., et al. Consequências Da Resistência Antimicrobiana No Tratamento Das Infecções Hospitalares / Consequences of Antimicrobial Resistance in the Treatment of Hospital Infections. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 29952–29967, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-625.
- BAX, R. Antibiotic resistance - a view from the pharmaceutical industry. **Clinical Infectious Diseases**. v. 24. p. s151-153. Jan 1997. DOI: 10.1016/S0165-7208(98)80062-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165720898800627>.

BEZERRA, A. G., CAVASSIN, P., MACHADO, T. N., et al. Surface-enhanced Raman scattering using bismuth nanoparticles: a study with amino acids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 11, 2017. DOI: 10.1007/s11051-017-4057-6.

BEZERRA, W. G. A., HORN, R. H., SILVA, I. N. G., et al. Antibióticos no setor avícola : uma revisão sobre a resistência microbiana, **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301–307, 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/495/49553570019.pdf>.

BLAIR, J. M. A., WEBBER, M. A., BAYLAY, A. J., et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3380.

BORA, T. Recent Developments on Metal Nanoparticles for SERS Applications. In: **Nanoscale Effects and Applications**, 2018. p. 117–135. DOI: 10.5772/intechopen.71573.

BOUZA, E., MUÑOZ, P., BURILLO, A. Role of the Clinical Microbiology Laboratory in Antimicrobial Stewardship. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 883–898, 2018. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.05.003>.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Boas Práticas em Microbiologia Clínica. Módulo 5-Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos. [Brasília]: [ANVISA], 2008a. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo5/introducao.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/introducao.htm). Acesso em: 21 mai. 2020

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de antimicrobianos em Serviços. Módulo 3-Resistência Microbiana- Mecanismos e Impacto. [Brasília]: [ANVISA], 2007a. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opa\\_web/modulo3/mecanismos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opa_web/modulo3/mecanismos.htm). Acesso em: 21 mai. 2020

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de antimicrobianos em Serviços de saúde. Módulo 1-Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico. [Brasília]: [ANVISA], 2007b. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opa\\_web/modulo1/aminoglicosideos6.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opa_web/modulo1/aminoglicosideos6.htm). Acesso em: 21 mai. 2020

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde - Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. [Brasília]: [ANVISA], 2021. Disponível em: <https://pncq.org.br/wp-content/uploads/2021/03/manual-prevencao-de-multirresistentes7.pdf> . Acesso em: 04 nov. 2021

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. PROJETO STEWARDSHIP BRASIL - Avaliação Nacional dos Programas de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Unidade de Terapia Intensiva Adulto dos Hospitais Brasileiros. [Brasília]: [ANVISA], 2019 Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Projeto+Stewardship+Brasil/435012dc-4709-4796-ba78-a0235895d901?version=1.0>. Acesso em: 21 mai. 2020

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Uso Racional de Antimicrobianos para Prescritores. Módulo 2-Interpretação de Dados Microbiológicos. [Brasília]: [ANVISA], 2008 b. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo2/introducao.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/introducao.htm). Acesso em: 21 mai. 2020

BORN M. e WOLF E. **Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light**. Pergamon Press, New York, 1964.

BUTLER, H. J., ASHTON, L., BIRD, B., et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials, **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 664–687, 2016. DOI: 10.1038/nprot.2016.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.036>.

CONSELHO FEDERAL DE ENFERMAGEM. **Resolução COFEN-218/1999** Aprova o regulamento que disciplina sobre Juramento, símbolo, cores e pedra utilizados na enfermagem. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em : [http://www.cofen.gov.br/resoluo-cofen-2181999\\_4264.html](http://www.cofen.gov.br/resoluo-cofen-2181999_4264.html)

CDC. **Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs**. US Department of Health and Human Services, CDC. Atlanta, GA, 2014. Disponível em: [http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html#\\_ENREF\\_46](http://www.cdc.gov/getsmart/healthcare/implementation/core-elements.html#_ENREF_46).

CIELECKA-PIONTEK, J., PACZKOWSKA, M., LEWANDOWSKA, K., *et al.* Solid-state stability study of meropenem – solutions based on spectrophotometric analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 98, p. 1–9, 8 dez. 2013. DOI: 10.1186/1752-153X-7-98. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-153X-7-98>.

CLAUDIA, G. **Avaliação da Vancocinemia em pacientes atendidos em um hospital universitário do Rio Grande do Sul**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, n. August, p. 762–767, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35021206.pdf>.

COSTA, A. L. P., SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação**

**Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45–57, 2017. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

CHU B. **Laser Light Scattering: Basis Principles and Practice**. 2 ed. Mineloa: Dover Publications, 2007.

DA SILVA, P. E. A., VON GROLL, A., MARTIN, A., et al. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, out. 2011. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2011.00831.x>.

DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, set. 2010. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/>.

DELLIT, T. H., OWENS, R. C., MCGOWAN, J. E., et al. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 159–177, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17173212/>.

DYAR, O. J., HUTTNER, B., SCHOUTEN, J., et al. What is antimicrobial stewardship?, **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 11, p. 793–798, 2017. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.08.026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.08.026>.

DŽIDIĆ, S., ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

EL-ZAHRY, M. R., REFAAT, I. H. , MOHAMED, H. A. , et al. Utility of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for elucidation and simultaneous determination of some penicillins and penicilloic acid using hydroxylamine silver nanoparticles. *Talanta*, v. 144, p. 710-716, 2015. Doi:10.1016/j.talanta.2015.07.015

FARIA, D. L. A., AFONSO, M. C., EDWARDS, H. G. M. Espectroscopia Raman: Uma Nova Luz no estudo de bens culturais. **Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 12, p. 249–267, 2002.

FAZIO E. et al. Nanoparticles Engineering by Pulsed Laser Ablation in Liquids: Concepts and Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2317, 2020.

FLEMING, A. **On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of b. influenzae**. 1929

GALVAN, D. D., YU, Q. Surface-Enhanced Raman Scattering for Rapid Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Advanced**

**Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–27, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201701335.

GARCÍA, M.D.M.R. **Uso de antibióticos durante la pandemia de COVID-19: Impacto sobre las resistências bacterianas**. 2022. Trabajo Fin de Grado (Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética – Facultad de Farmacia) Universidad de La Laguna. San Cristóbal de La Laguna, 2022

GELPI, A., GILBERTSON, A., TUCKER, J. D. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan and the birth of venereology. **Sexually Transmitted Infections**, v. 91, n. 1, p. 68-69, 2015. DOI: 10.1136/sextrans-2014-051779. Disponível em: <https://sti.bmj.com/lookup/doi/10.1136/sextrans-2014-051779>.

GUAREZE, G. M., BORDIGNON, J. C. Estudo Comparativo entre hemocultura automatizada e manual em um laboratório do sudeste do Paraná, Brasil. **Revista RBAC**, v. 48, n. 3, p. 223–228, 2016. DOI: 10.21877/2448-3877.201700580. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/estudo-comparativo-entre-hemocultura-automatizada-e-manual-em-um-laboratorio-do-sudoeste-do-parana-brasil-48n-3/>.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. da S., PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000300035.

HAN LEE, J. Y, LIAO, J., SITJAR, J. *et al.* Dielectric Nanoparticles Coated upon Silver Hollow Nanosphere as an Integrated Design to Reinforce SERS Detection of Trace Ampicillin in Milk Solution. *Coating*. V.10, n. 390, 2020. Doi:10.3390/coatings10040390

HARTINGER, S. M., MEDINA-PIZZALI, M. L., SALMON-MULANOVICH, G., *et al.* Antimicrobial resistance in humans, animals, water and household environs in rural andean peru: Exploring dissemination pathways through the one health lens. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/ijerph18094604.

HUGHES, S. J., MOORE, L. S. Antimicrobial stewardship. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 80, n. 3, p. C42–C45, 2019. DOI: 10.12968/hmed.2019.80.3.C42. Disponível em: <http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/hmed.2019.80.3.C42>.

HUTCHINGS, M. I., TRUMAN, A. W., WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

JORGENSEN, J. H., FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 2009. DOI: 10.1086/647952.



KHAN, Z. A., SIDDIQUI, M. F., PARK, S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. **Diagnostics**, v. 9, n. 2, 2019. DOI: 10.3390/diagnostics9020049.

KNEIPP, K., KNEIPP, H., KNEIPP, J. Surface-enhanced raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates - From single-molecule raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 7, p. 443–450, 2006. DOI: 10.1021/ar050107x.

KRESGE, N., SIMONI, R. D., HILL, R. L. Selman Waksman: the Father of Antibiotics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. e7–e8, 2004. DOI: 10.1016/s0021-9258(20)67861-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)67861-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(20)67861-9).

LAVAGNOLI, L. S., BASSETTI, B. R., KAISER, T. D. L., et al. Fatores associados à aquisição de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, 2017. DOI: 10.1590/1518-8345.1751.2935.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e imunologia**. Porto Alegre: AMGH, 2010.

LIU, C. Y., HAN, Y. Y., SHIH, P. H., et al. Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surface-enhanced Raman spectroscopic biomarkers. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1038/srep23375. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep23375>.

LIU, H., WANG, Y., WANG, N., et al. The determination of plasma voriconazole concentration by surface-enhanced Raman spectroscopy combining chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 193 p. 103833, 2019. DOI: 10.1016/j.chemolab.2019.103833. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.103833>.

MACHADO, T. N. *et al.* Plasmonics with non-conventional metal nanoparticles. In: Encontro de Outono da Sociedade Brasileira de Física (EOSBF), 2020, Evento Virtual. **Anais do EOSBF-2020**, 2020

MACHADO, T. N. **Síntese, Caracterização E Investigação Da Atividade Sers De Nanopartículas De Metais Não-Convencionais**. 2021. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2021.

MAJUMDER, M. A. A; RAHMAN, S.; *et al.* Antimicrobial Stewardship: Fighting Antimicrobial Resistance and Protecting Global Public Health. **Infection and Drug Resistance**, 13:4713-4738, dez. 2020. DOI: 10.2147/IDR.S290835. Disponível em: <http://doi.org/10.2147/IDR.S290835>.

MARANGONI, C. G. P. S., MACHADO, T. N., THALER, J., et al. Detecção e caracterização de antimicrobianos usando Espectroscopia Raman amplificada

por superfície. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101999, 2022. DOI: 10.1016/J.BJID.2021.101999.

MCGOWAN JR, J E; GERDING, D. A restrição de antibióticos previne a resistência? **New Horizons**, v. 4, n. 3, p. 370–376, 1996.

MCNAY, G., EUSTACE, D., SMITH, W. E., et al. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERRS): A review of applications. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 825–837, 2011. DOI: 10.1366/11-06365.

MCNULTY, C., HAWKING, M., LECKY, D., et al. Effects of primary care antimicrobial stewardship outreach on antibiotic use by general practice staff: Pragmatic randomized controlled trial of the TARGET antibiotics workshop. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1423–1432, 2018. DOI: 10.1093/jac/dky004.

MENEZES, M. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. Instituto Oswaldo Cruz. **FIOCRUZ**, 23 nov. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>

MITSUTAKE, H., POPPI, R. J., BREITKREITZ, M. C. Raman imaging imaging spectroscopy: Spectroscopy: History, history, fundamentals fundamentals and current and current scenario scenario of the technique the technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 11, p. 2243–2258, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20190116.

MUNITA, J. M., ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 95–99, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

NOGUEIRA, S. H., XAVIER, A. R. E. de O., XAVIER, M. A. de S., et al. Antibacterianos : Principais Classes , Mecanismos De Ação E Resistência. **Revista Unimontes Científica**, v. 18, n. 2, p. 96–108, 2016. Disponível em: <http://ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/523>.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired**. December, 2014.

O'NEILL, J. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations: The Review on Antimicrobial Resistance** , 2016. Disponível em: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final\\_paper\\_with\\_cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final_paper_with_cover.pdf).

OLIVEIRA, J. F. P., CIPULLO, J. P., BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 4, p. 444–452, 2006. DOI: 10.1590/S1678-97412006000400015.

OPOTA, O., CROXATTO, A., PROD'HOM, G., et al. Blood culture-based diagnosis of bacteremia: State of the art. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 4, p. 313–322, 2015. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>.

PEREIRA, R. E. P., PETRECHEN, G. G. Principais métodos de diagnósticos bacterianos. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 16, n. 1679–7353, 2011. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Ffaef.revista.inf.br%2Fimagens\\_arquivos%2Farquivos\\_destaque%2Fu94lwYWgePGj05L\\_2013-6-26-11-11-29.pdf&clen=211841&chunk=true](chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Ffaef.revista.inf.br%2Fimagens_arquivos%2Farquivos_destaque%2Fu94lwYWgePGj05L_2013-6-26-11-11-29.pdf&clen=211841&chunk=true).

PILOT, R., SIGNORINI, R., DURANTE, C., et al. A review on surface-enhanced Raman scattering. **Biosensors**, v. 9, n. 2, 2019. DOI: 10.3390/bios9020057.

PLAUTZ, Gabriela L. **Caracterização Óptica e Estrutural de Pontos Quânticos de Silício Obtidos por Ablação a Laser em Água**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

QIAN, H., SHAO, X., ZHU, Y., et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of preoperative serum samples predicts Gleason grade group upgrade in biopsy Gleason grade group 1 prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 000, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1016/j.urolonc.2020.02.009.

RASHIDA, P. **Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo**. 2017. 137f. Tese (Doutorado em química analítica e Inorgânica), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

RAWSON, T. M., ZHU, N., RANGANATHAN, N., et al. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing Timothy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. 2459–2468, 2020.

RIBEIRO, A.M.F. **Farmacologia dos Antibióticos Aminoglicosídeos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2017.

RODRIGUES-SILVA, C., MANIERO, M. G., PERES, M. S., et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 868–885, 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140139.

ROUESSAC F., ROUESSAC A. **Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques**. S.i: Wiley, 2007

SALA, O. **Vibrações em cristais. Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**, 2008

SANTOS, A. R., MENEZES, D. B., ELLENA, J., et al. Application of raman spectroscopy in the characterization of minerals belonging to a geocollection. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 489–496, 2019.

SANTOS, Raquel O. **Síntese física e caracterização de pontos quânticos de tungstênio**. 2022. 89 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2022.

SILVA, R. A. da, OLIVEIRA, B. N. L. de, SILVA, L. P. A. da, et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 607–623, 2020. DOI: 10.1590/0103-1104202012602.

SMITH, E., DENT, G. **Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach**. Inglaterra, John Wiley & Sons, 2005.

SMITH, M. Antibiotic Resistance Mechanisms. **Journeys in Medicine and Research on Three Continents Over 50 Years**, n. May 2017, p. 95–99, 2017. DOI: 10.1142/9789813209558\_0015.

TERRA, M. R., SILVA, R. S. DA. Vancomicina-Um Antimicrobiano De Importância Nosocomial. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 19, n. 3, p. 76–80, 2017. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/bjscr>.

THALER, J. **Espectroscopia Raman Amplificada por superfície com nanopartículas de Ni, Co e Bi para a detecção de biomoléculas e microorganismos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

THE GUARDIAN. **Organização mundial da saúde adverte que uso excessivo de antibióticos para Covid-19 causará mais mortes**. The Guardian, 2020. Disponível em: <https://www.theguardian.com/world/2020/jun/01/who-warns-overuse-of-antibiotics-for-covid-19-will-cause-more-deaths>.

VAN BOECKEL, T. P., GANDRA, S., ASHOK, A., et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7).

VENTER, H., HENNINGSEN, M. L., BEGG, S. L. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: The biochemistry behind the headlines. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1042/EBC20160053.

VILA, M. M. D. C. et al. Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 395-399, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200029

VIVAS, R., BARBOSA, A. A. T., DOLABELA, S. S., et al. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 890–908, 2019. DOI: 10.1089/mdr.2018.0319. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2018.0319>.

WEIS, C. V., JUTZELER, C. R., BORGWARDT, K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 10, p. 1310–1317, 2020. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.03.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.014>.

WHALEN, K., RICHARD, F., PANAVELIL, T. A. **Farmacologia Ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

WHO. **Clinical management Clinical management Living guidance COVID-19**. World Health Organization, n. January, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>.

WHO. **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017**. World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf>.

WORLD BANK. **By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis**. Disponível em: <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis.2016>

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12: 3-7, 1999. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00085-0

WRIGHT, A. J. The penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 3, p. 290–307, 1999. DOI: 10.4065/74.3.290.

YAN Z. e CHRISEY, D. B. Pulsed laser ablation in liquid for micro-/nanostructure generation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 13, n. 3, p. 204-223, 2012.

ZHANG D., GÖKCE B., BARCIKOWSKI S. Laser Synthesis and Processing of Colloids: **Fundamentals and Applications**. **Chemical Reviews**, American Chemical Society (ACS), v. 117, n. 5, p. 3990-4103, 2017.

## TRABALHOS PUBLICADOS FRUTOS DA PESQUISA

Alguns trabalhos foram desenvolvidos no decorrer da pesquisa, conforme registro abaixo.

### Trabalhos completos publicados em anais de congressos

- 1- MARANGONI, C. G. P. S.; MACHADO, T. N.; THALER, J.; NADAS, R. B.; FEITOSA, L. F.; MARCINIAK, T. C.; KERKHOVEN, N. C.; SANTOS, M. L. F.; GOES, R. E.; DALLA-COSTA, L. M.; SCHREINER, W. H.; SETTI, J. A. P.; FOTI, L.; BEZERRA JR, A. G. Detecção de antibióticos em solução por espectroscopia Raman intensificada por nanopartículas de bismuto, antimônio e cobalto. In: **XXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB 2020)**, 2020, Vitória. Anais do CBEB 2020, 2020.

### Resumos publicados em anais de congressos

- 1- L. FOTI; J. KASUKO; T. D. WOISKI; L. M. DALLA COSTA; W. H. SCHREINER; C. G. P. S. MARANGONI; T. N. MACHADO; R. B. NADAS; J. THALER; J. A. LENZ; R. E. DE GÓES; R. C. KAMIKAWACHI; A. G. BEZERRA-JR. Antibiotics detection using surface-enhanced Raman scattering. In: **Encontro de Outono da SBF 2019**, 2019, Aracaju. Anais EOSBF2019, 2019.
- 2- ANJOS, V.P; MARANGONI, C.G.P.S; MACHADO, T.N.; COSTA, L.M.D.; DE GOES, R.E.; SCHEREINER, W.H.; BEZERRA-JR, A.G. Detection and characterization of antimicrobials by Raman/SERS Spectroscopy. In: **XX B-MRS Meeting**, Foz do Iguaçu, 2022.

### Resumos publicados em periódicos

- 1- MARANGONI, CGPS; MACHADO, TN; THALER, J; ANJOS, VP; BARROS, FS; COSTA, LMD; DE GOES, RE; SCHEREINER, WH; BEZERRA-JR, AG. Detecção e caracterização de antimicrobianos utilizando a espectroscopia

Raman Amplificada por superfície. In: **braz j infect dis**. 2022;26(S1):101996  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101999>