



## **Universidade do Algarve**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Estratégias para minimizar o impacto do uso abusivo de antibióticos**

**Yuliya Maslenko**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Maria Leonor Faleiro

**2022**

Estratégias para minimizar o impacto do uso abusivo de antibióticos

# **Estratégias para minimizar o impacto do uso abusivo de antibióticos**

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Yuliya Maslenko)

Copyright©

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Leonor Faleiro, pela disponibilidade, apoio e esclarecimento de dúvidas.

Ao Doutor Tiago Santos Pinto, Diretor Técnico, à Doutora Sofia e a toda a equipa da Farmácia Santos Pinto agradeço pela oportunidade de realização do estágio curricular, simpatia, disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas e por todos os conhecimentos transmitidos para o meu enriquecimento profissional.

Aos meus pais, agradeço por toda a dedicação e apoio que me permitiu alcançar os meus objetivos.

Ao Ruben, pela motivação que me transmite e por sempre me incentivar a dar o meu melhor.

Aos meus amigos e colegas de casa que me aturaram nestes últimos anos, que me apoiaram em todos os momentos e ajuda nos momentos mais difíceis. Agradeço por toda a amizade e compreensão, pelos bons momentos e boas memórias criadas.

A todos os professores da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve que me acompanharam neste percurso, muito obrigada.

## Resumo

Ao longo da história da humanidade, as doenças infecciosas de origem bacteriana têm causado uma perda incalculável de vidas. No século XX são introduzidos os primeiros agentes terapêuticos para o tratamento destas infecções, nesta época é introduzido o primeiro de muitos antibióticos, a penicilina. Estes fármacos antibacterianos são moléculas desenvolvidas para combater bactérias patogênicas que podem atuar em diferentes alvos celulares, de acordo com a bactéria de interesse e a estrutura química do antibiótico. Contudo, após a introdução destes agentes terapêuticos que pelo seu uso indevido e abusivo rapidamente se verificou o desenvolvimento de resistências pelas bactérias.

O desenvolvimento da resistência aos agentes antibacterianos é um processo que pode ocorrer de forma espontânea através de mutações, onde as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência, nomeadamente, alterações dos alvos celulares dos antibióticos, diminuição da entrada ou aumento do efluxo dos antibióticos e inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação enzimática. No entanto, os antibióticos exercem uma pressão seletiva e atividades antropogênicas como, a prescrição inadequada destes agentes terapêuticos, utilização descontrolada de antibióticos na indústria pecuária e na aquicultura com a respetiva contaminação ambiental, contribuem para a disseminação de estirpes bacterianas resistentes.

As consequências da resistência aos antibióticos implicam o aumento das infecções por bactérias multirresistentes de difícil tratamento, dificuldade na realização de determinados procedimentos médicos, impacto na microbiota intestinal, mitocôndrias, indústria animal e no meio ambiente.

A presente dissertação foca-se na temática do impacto da resistência e uso excessivo dos antibióticos na terapêutica humana, na indústria animal e no meio ambiente. A abordagem é realizada com particular incidência nas estratégias e tecnologias a desenvolver para mitigar os impactos deste problema no meio ambiente, as boas práticas de utilização de antibióticos e as opções alternativas à utilização de antibióticos.

**Palavras-chave:** Antibióticos, estratégias, impacto, indústria animal, meio ambiente, saúde pública, resistência aos antibióticos

## Abstract

Throughout human history, infectious diseases of bacterial origin have led to an immeasurable loss of life. In the 20th century the first therapeutic agents for the treatment of these infections were introduced; at this time the first of many antibiotics, penicillin, was introduced. These antibacterial drugs are molecules developed to fight pathogenic bacteria, which can act on several cellular targets depending on the bacteria of interest and the chemical structure of the antibiotic. However, following the introduction of these therapeutic agents, which due to their misuse and abuse, the bacterial resistance has rapidly developed.

The development of resistance to antibacterial agents is a process that can occur spontaneously through mutations, where bacteria develop resistance mechanisms, namely changes in the intracellular targets of antibiotics, decreased entry or increased efflux of antibiotics and inactivation of antibiotics by hydrolysis or enzymatic modification. However, antibiotics exert a selective pressure and anthropogenic activities such as, inappropriate prescription of these therapeutic agents, unguided use of antibiotics in livestock industry and aquaculture with the respective environmental contamination, contribute to the spread of resistant bacterial strains.

The consequences of antibiotic resistance implicate increased infections by multidrug-resistant bacteria that are difficult to treat, difficulty in performing certain medical procedures, impact on the intestinal microbiota, mitochondria, the animal husbandry, and the environment.

This dissertation focuses on the impact of resistance and overuse of antibiotics on human therapy, animal industry and the environment. This approach is carried out with particular focus on strategies and technologies to be developed to mitigate the impact of this problem on the environment, good practices in the use of antibiotics and alternative options to the use of antibiotics.

**Keywords:** Antibiotics, strategies, impact, animal industry, public health, antibiotic resistance

## Índice

1. Introdução.....	1
2. Impacto do uso abusivo de antibióticos na terapêutica humana e em animais.....	4
2.1. Impacto do uso excessivo de antibióticos na terapêutica humana.....	4
2.1.1. Estratégias moleculares e celulares do desenvolvimento de resistências.....	4
2.1.1.1. Alteração dos alvos intracelulares dos antibióticos.....	5
2.1.1.2. Diminuição da entrada ou aumento do efluxo dos antibióticos.....	6
2.1.1.3. Inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação enzimática.....	6
2.1.1.4. Formação de biofilmes.....	6
2.1.2. Infecções por bactérias multirresistentes.....	8
2.1.3. Impacto das resistências na realização de procedimentos médicos.....	10
2.1.4. Consequências para a microbiota intestinal humana.....	10
2.1.5. Impacto nas mitocôndrias.....	11
2.2. Impacto do uso excessivo de antibióticos em animais.....	12
2.2.1. Consequências do uso excessivo de antibióticos na pecuária.....	12
2.2.2. Consequências do uso abusivo de antibióticos na aquicultura.....	14
3. Impacto dos antibióticos no meio ambiente.....	16
3.1. Impacto dos antibióticos no solo e nas plantas.....	16
3.2. Impacto dos antibióticos no meio aquático.....	18
4. Estratégias para a mitigação dos problemas no meio ambiente. O conceito de Saúde Global (One Health).....	20
4.1. Técnicas de eliminação de antibióticos nos Sistemas de Tratamento de Efluentes.....	20
4.1.1. Tratamento por Zonas Húmidas Construídas (ZHC).....	22
4.1.2. Tratamento por Processos de Oxidação Avançados (POA).....	24
4.1.3. Tratamento com Microalgas.....	30
5. Boas práticas de utilização de antibióticos.....	35
5.1. Médicos/Prescritores.....	35
5.2. Farmacêuticos.....	36
5.3. Comunidade em geral.....	37
5.4. Veterinários e Produtores Pecuários.....	38

6. Alternativas e ações complementares à utilização de antibióticos.....	39
6.1. Probióticos e Prébióticos.....	39
6.1.1. Probióticos.....	39
6.1.1.1. Benefícios e Riscos para a Saúde.....	39
6.1.1.2. Mecanismos de ação.....	40
6.1.1.3. O risco de desenvolvimento de resistências nos probióticos.....	42
6.1.2. Prebióticos.....	42
6.2. Bacteriocinas.....	43
6.2.1. Mecanismos de ação.....	44
6.2.2. Aplicação das Bacteriocinas na área da Saúde.....	46
6.2.3. Mecanismo de resistência às bacteriocinas.....	48
6.3. Vacinas.....	49
6.3.1. Benefícios das vacinas no combate contra a resistência aos antibióticos.....	50
6.3.2. Desenvolvimento de novas vacinas contra bactérias resistentes.....	52
6.4. Produtos de origem vegetal.....	52
6.4.1. Óleos Essenciais.....	52
6.4.1.1. Mecanismos de ação.....	53
6.4.1.2. Atividade antibacteriana.....	55
6.4.1.3. Combinação com antibióticos.....	57
6.4.1.4. Limitações.....	58
6.5. Estimulantes do sistema imunitário.....	58
6.5.1. Anticorpos monoclonais.....	58
7. Conclusão.....	62
8. Referências bibliográficas.....	63

## Índice de Figuras

Figura 2.1 – Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. (A) Diminuição do influxo ou aumento do efluxo de antibióticos. (B) Inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação enzimática. (C) Alteração dos alvos dos antibióticos.

Figura 2.2 – Etapas da formação de um biofilme.

Figura 2.3 – Mecanismos de resistência observados em células em biofilme.

Figura 2.4 – Disbiose da microbiota humana e o seu efeito nos diversos órgãos.

Figura 3.1 – Vias de exposição humana aos resíduos de antibióticos.

Figura 4.1 – Processos de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais e locais onde podem ocorrer intervenções de mitigação da resistência aos antibióticos.

Figura 4.2 – Mecanismos de eliminação dos antibióticos por microalgas, como bioadsorção, bioacumulação e biodegradação.

Figura 6.1 - Fatores que podem influenciar a atividade biológica e a estabilidade das bacteriocinas através do trânsito no trato gastrointestinal.

Figura 6.2 – Mecanismos de ação antibacteriana dos óleos essenciais.



## **Índice de Tabelas**

Tabela 2.1 – Lista de microrganismos prioritários no desenvolvimento e investigação de novos antibióticos.

Tabela 6.1 - Atividade antibacteriana de alguns óleos essenciais contra diferentes bactérias.



## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AP</b>	Antigénio protetor
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ARB</b>	Bactérias resistentes aos antibióticos (do inglês Antibiotic Resistant Bacteria)
<b>ARG</b>	Genes de resistência a antibióticos (do inglês Antibiotic Resistant Genes)
<b>AS</b>	<i>Antimicrobial Stewardship</i>
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
<b>FE</b>	Fator de edema
<b>FL</b>	Fator letal
<b>MAb 65</b>	Anticorpo monoclonal 65
<b>mAbs</b>	Anticorpos monoclonais
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina-resistente
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBP</b>	Proteínas de ligação à penicilina (do inglês Penicillin Binding Protein)
<b>pKa</b>	Constante de dissociação
<b>POA</b>	Processos de Oxidação Avançados
<b>PRR</b>	Recetores de Reconhecimento Padrão Transmembranares (do inglês Pattern Recognition Receptors)
<b>QS</b>	Perceção de quórum (do inglês Quorum sensing)
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio (do inglês Reactive Oxygen Species)
<b>rARN</b>	Ácido ribonucleico ribossomal
<b>T3SS</b>	Sistema secretor do tipo III
<b>tARN</b>	Ácido ribonucleico de transferência
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento $\beta$ (do inglês Transforming Growth Factor $\beta$ )

<b>TLR</b>	Recetor do tipo Toll (do inglês Toll-like receptor)
<b>UE</b>	União Europeia
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VRE</b>	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
<b>ZHC</b>	Zonas Húmidas Construídas

## 1. Introdução

Os antibióticos são substâncias químicas que são naturalmente produzidos por bactérias, fungos e outros microrganismos, estes compostos têm como função inibir o crescimento bacteriano ou eliminar a sua viabilidade. Sendo que, o primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto em 1928 pelo bacteriologista Alexander Fleming (1,2).

No último século, a descoberta dos antibióticos como agentes terapêuticos eficazes para o tratamento das infecções bacterianas e o controlo da sua disseminação, resultou em importantes ganhos para a saúde global. Os medicamentos antibacterianos são maioritariamente utilizados para o tratamento de infecções provocadas por bactérias, mas são igualmente essenciais para o sucesso de diversas práticas clínicas, como a quimioterapia, os transplantes e as intervenções cirúrgicas. Em países menos desenvolvidos e com falta de saneamento, estes fármacos contribuem grandemente para a diminuição da morbidade e mortalidade provocada por diferentes infecções incluindo as de origem alimentar e consumo de água contaminada (1,3,4).

No entanto, apesar da grande eficácia desta classe terapêutica rapidamente se verificou que a utilização dos antibióticos tem limitações. Estas limitações estão associadas ao desenvolvimento de resistência pelas bactérias. A resistência aos antibióticos ocorre de forma natural, contudo, o uso abusivo e inadequado destes medicamentos agrava este fenómeno. (3,4).

A resistência ocorre quando a capacidade de ação dos antibióticos sobre as bactérias é reduzida ou mesmo eliminada. Do mesmo modo, este fenómeno também pode ocorrer em fármacos usados para controlar fungos, parasitas ou vírus, o que geralmente designa-se por resistência a antimicrobianos (1).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global, à segurança alimentar e ao desenvolvimento. Em 2017, a OMS, publicou uma lista de “bactérias prioritárias” resistentes a antibióticos que estão indicadas no **Tabela 2.1**.

Num estudo realizado em 2014, foi estimado que a resistência aos antimicrobianos poderá ser responsável por 10 milhões de mortes anualmente até 2050. Adicionalmente, em 2019, estimou-se que ocorreram 4,95 milhões de mortes mundialmente devido à resistência aos antibióticos. (3,5–7).

**Tabela 2.1** – Lista de bactérias prioritárias no desenvolvimento e investigação de novos antibióticos (7).

Bactéria	Resistência a Antibióticos
<b>Prioridade 1 – Crítico</b>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenemos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemos
<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenemos, Cefalosporinas 3. <sup>a</sup> geração

<b>Prioridade 2 – Elevado</b>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, Vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolona
<i>Salmonella spp.</i>	Fluoroquinolona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolona, Cefalosporinas 3. <sup>a</sup> geração
<b>Prioridade 3 – Médio</b>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não suscetível à Penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolona

Diversos fatores contribuem para a evolução da resistência aos antibióticos, como o uso excessivo destes medicamentos; prescrição médica inadequada; uso intensivo na agricultura e pecuária (4,8).

A resistência aos antibióticos é um processo que pode ocorrer de forma espontânea através de mutações, contudo, os antibióticos exercem uma pressão seletiva, visto que, as células bacterianas mais suscetíveis morrem e as células mais resistentes podem desenvolver estratégias moleculares para ultrapassar a ação do antibiótico tornando-se resistentes. Desta forma, existe uma relação direta entre o consumo destes medicamentos e a ocorrência, e disseminação de estirpes bacterianas resistentes, como foi demonstrado por estudos epidemiológicos (9). Adicionalmente, antibióticos prescritos de forma incorreta, ou seja, com posologias não adequadas podem levar a concentrações subterapêuticas, o que predispõe ao desenvolvimento de mecanismos de resistência. (4).

Na produção pecuária estes fármacos são utilizados não só no tratamento de infecções bacterianas, como profilaxia e metafilaxia, mas também na promoção do crescimento dos animais. Estas práticas levam a uma intensa seleção do microbioma intestinal dos animais e, para além disto, as bactérias resistentes podem ser transmitidas através da cadeia alimentar aos humanos podendo provocar infecções difíceis de tratar ou até mesmo infecções fatais. Isto deve-se a que cerca de 90% dos antibióticos são excretados pelos animais sendo posteriormente dispersos através do estrume contaminando o solo e água potável com estes compostos e com bactérias resistentes ou mesmo genes de resistência (4,8,10).

O sistema de tratamento de efluentes é um ambiente propício para a proliferação de microrganismos, dado que, reúne as condições ideais, como um ambiente com elevada disponibilidade de nutrientes. Esta elevada concentração de microrganismos também permite a transferência horizontal de genes, alguns dos quais podem codificar para a resistência aos antibióticos entre espécies bacterianas diferentes contribuindo para o agravamento deste problema (8,11).

As infecções provocadas por bactérias resistentes a antibióticos (ARB) conduzem a patologias mais severas, internamento hospital mais prolongado, aumento das despesas com

a saúde, e potenciais falhas no tratamento o que está associado a uma maior morbimortalidade. (12)

Na presente monografia pretende-se compreender as fontes da resistência aos antibióticos e evidenciar as principais estratégias para minimizar este problema. Para isto foi realizada uma revisão bibliográfica abrangendo os últimos 5 anos, incluindo artigos de diversas áreas, tais como farmacologia, microbiologia e medicina. As bases de dados consultadas incluíram a PubMed e Web of Science utilizando as seguintes palavras chave: *antibiotic resistance*, *mitigation of the antibiotic resistance*, *impacto of the antibiotic resistance*, e *alternatives to antibiotics*. Em primeiro lugar, é apresentado o impacto do uso excessivo desta classe de medicamentos na terapêutica humana e em animais, como também o impacto desta classe terapêutica no meio ambiente. Posteriormente, são indicadas algumas estratégias para reduzir os problemas provocados pelo uso excessivo e indevido de antibióticos, bem como são referidas as boas práticas de utilização dos antibióticos. Por fim, são apresentadas alternativas e atividades complementares à utilização dos antibióticos.

## **2. Impacto do uso abusivo de antibióticos na terapêutica humana e em animais como uma das fontes de resistência aos antibióticos**

Ao longo dos anos a humanidade teve dificuldades no controle e eliminação de infecções bacterianas, contudo com a descoberta dos antibióticos acreditou-se que este problema podia ser controlado e até mesmo eliminado. No entanto, as infecções continuam a ser uma das principais causas de morte. Isto ocorre devido ao surgimento de novas doenças, à reemergência de doenças que se encontravam controladas, mas principalmente devido ao desenvolvimento da resistência aos antibióticos e outros agentes antimicrobianos (13).

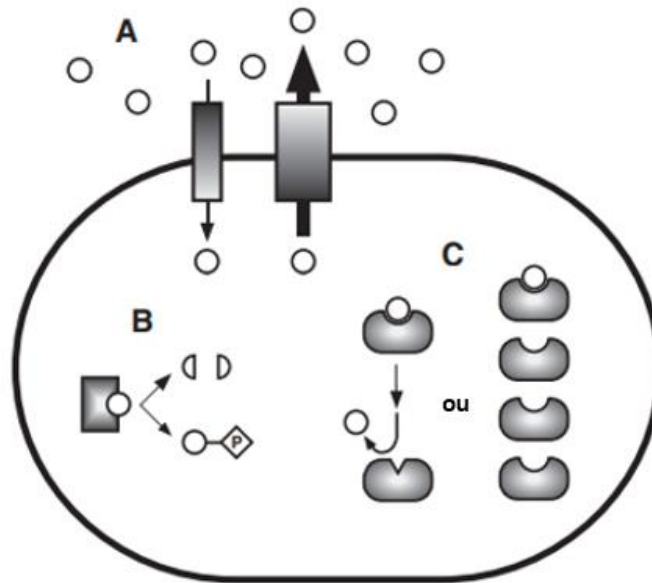
Neste capítulo vai ser explorado o impacto e consequências do uso excessivo e inadequado de antibióticos na terapêutica humana e em animais.

### **2.1 Impacto do uso excessivo de antibióticos na terapêutica humana**

#### **2.1.1 Estratégias moleculares e celulares do desenvolvimento de resistências**

A resistência apresentada pelas bactérias aos antibióticos pode ser de três tipos: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca ocorre naturalmente nos genomas bacterianos e está associada à capacidade inata que todos, ou quase todos, os procariotas têm para resistir a medicamentos específicos. Relativamente à resistência adaptativa, esta consiste na resistência a um ou mais antibióticos induzida por sinais ambientais específicos e que, potencialmente ocorre devido a alterações epigenéticas. Esta categoria de resistência ocorre quando uma bactéria previamente sensível a um antibiótico adquire mecanismos de resistência através de mutações ou através da aquisição de novo material genético pela transferência horizontal de genes (14,15).

Os mecanismos de resistência podem ser agrupados naqueles que i) alteram os alvos dos antibióticos, ii) os que diminuem a entrada ou aumentam o efluxo dos antibióticos, iii) os que inativam os antibacterianos por hidrólise ou por alterações enzimáticas e iv) a formação de biofilmes (14,15). Na **Figura 2.1** são exemplificados alguns mecanismos de resistência que serão descritos seguidamente.



**Figura 2.1** – Mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos. (A) Diminuição do influxo ou aumento do efluxo de antibióticos. (B) Inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação enzimática. (C) Alteração dos alvos dos antibióticos (Adaptado de (16)).

#### 2.1.1.1 Alteração dos alvos intracelulares dos antibióticos

O mecanismo de resistência mais comum para antibióticos sintéticos como as sulfonamidas, trimetoprim e quinolonas e para os antibióticos de origem natural como rifampicina é a modificação dos seus alvos. Esta alteração pode ocorrer devido a mutações espontâneas nos genes bacterianos ou pela aquisição de novos genes transportados por plasmídeos ou transposões. Deste modo, como a interação do agente antibacteriano com a sua molécula alvo é muito específica, uma ligeira alteração nesse alvo vai impedir a ligação do fármaco (13,16). Por exemplo, em *Streptococcus pneumoniae*, ocorrem modificações nas proteínas de ligação à penicilina (PBP), levando a uma menor afinidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (15).

Para os antibióticos que afetam a síntese proteica, como os macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol, podem ocorrer alterações na subunidade 30S ou subunidade 50S dos ribossomos o que impede com que estes fármacos se liguem ao seu alvo. Um outro mecanismo de resistência é o aumento da produção do alvo, por exemplo no caso da resistência ao trimetoprim pela bactéria *E. coli*, ocorrem mutações que levam a uma maior expressão de genes que codificam para a enzima di-hidrofolato redutase, consequentemente, as moléculas de fármaco disponíveis não são suficientes para inibir os alvos em excesso (13,15). Quer em bactérias Gram-positivas, quer em Gram-negativas pode ocorrer o mecanismo de resistência através da proteção do alvo, como no caso de proteínas codificadas pelo gene *qnr* que conferem a resistência a quinolonas, dado que, atuam como um análogo do ácido desoxirribonucleico (ADN) e reduzem a interação da enzima ADN girase bacteriana e da topoisomerase IV com o ADN e, deste modo, diminuem a disponibilidade dos locais de ligação das quinolonas (13,15).

### **2.1.1.2 Diminuição da entrada ou aumento do efluxo dos antibióticos**

As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que medeia a permeabilidade de várias substâncias, incluindo os antibióticos. Relativamente aos antibióticos hidrofílicos (antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, tetraciclinas e cloranfenicol), estes conseguem penetrar nas bactérias Gram-negativas através das porinas que se localizam na membrana externa. Deste modo, mutações que afetem a função e expressão das porinas podem contribuir para o desenvolvimento de resistência adquirida aos antibióticos. Por exemplo, no caso da bactéria *P. aeruginosa* que devido a uma mutação no gene que codifica o canal OprD2 vai ocorrer uma diminuição da entrada de carbapenemos levando ao desenvolvimento de resistência a este fármaco (13,15,17).

Um outro mecanismo que contribui para a resistência aos antibióticos são as bombas de efluxo. Estes são sistemas dependentes de energia que se encontram na membrana plasmática e que reduzem a concentração de substâncias nocivas no meio intracelular, expulsando a substância para o exterior da bactéria. Desta forma, os antibióticos são expulsos mais rapidamente do que entram para o interior das bactérias. Estas bombas de efluxo podem ser específicas para um determinado antibiótico, ou então conseguem transportar diversos antibióticos não relacionados, como macrólidos e tetraciclinas, contribuindo para o desenvolvimento de multirresistências (13–15,17,18). No caso da bactéria *Acinetobacter baumannii*, a presença de mutações no regulador de resposta AdeR e no sensor de quinase AdeS da bomba de efluxo AdeABC leva a um aumento no efluxo de fluoroquinolonas e, conseqüentemente, à resistência a este fármaco (19).

### **2.1.1.3 Inativação dos antibióticos por hidrólise ou modificação enzimática**

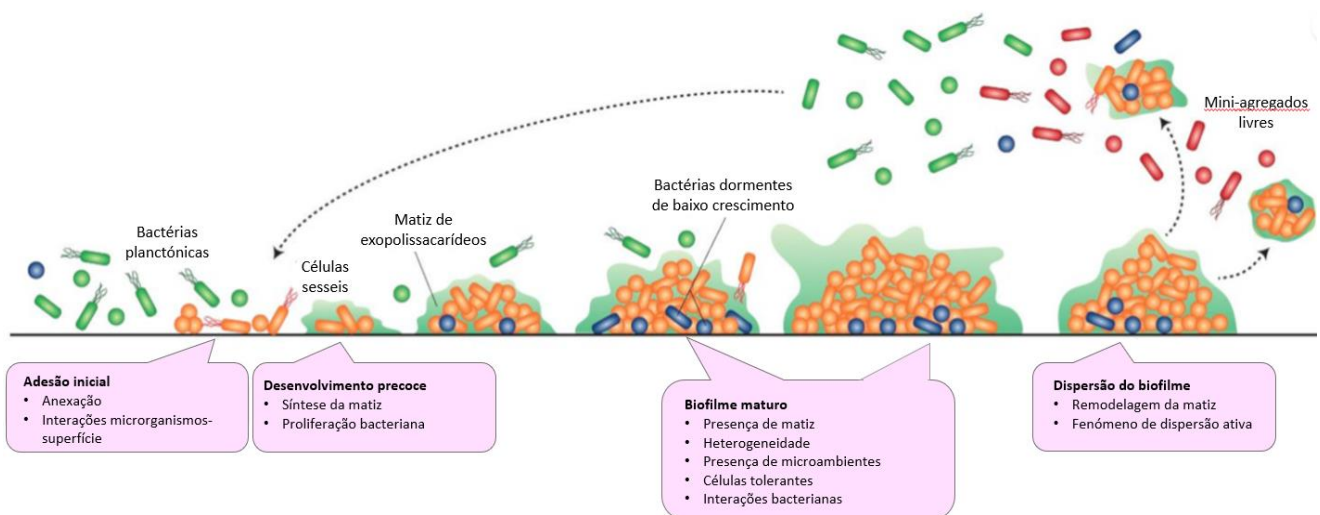
A inativação enzimática é um dos mecanismos de resistência aos antibióticos mais comum. A inativação pode ocorrer por hidrólise, como ocorre no caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactâmicos), onde as enzimas  $\beta$ -lactamases vão hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico impedindo a ligação às PBPs, tornando o antibacteriano ineficaz (13,15,16).

Relativamente à modificação enzimática, esta pode ocorrer por adenililação, acetilação e fosforilação dos antibióticos por ação de enzimas bacterianas o que inativa o agente antibacteriano. Os aminoglicosídeos são inativados por fosfo-transferases, adenilil-transferases ou acetil-transferases, também denominadas de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Estas enzimas vão reduzir a afinidade do fármaco e impedir que a molécula se ligue à subunidade 30S do ribossoma. Este mecanismo pode ser detetado em bactérias como *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. pneumoniae* (15,17). No caso do cloranfenicol por ação da enzima cloranfenicol transacetilase ocorre a acetilação dos grupos hidroxilo, com a conseqüente limitação da ligação do antibiótico à subunidade 50S do ribossoma permitindo o desenvolvimento de resistência (13,15).

### **2.1.1.4 Formação de biofilmes**

Os biofilmes bacterianos são um grupo organizado de células microbianas aderentes a uma superfície e envoltas numa matiz de exopolissacarídeos (células sesséis). A formação do

biofilme começa com a adesão de algumas células planctônicas a uma superfície, seguida pela formação de microcolônias, maturação do biofilme e posterior dispersão deste. Na **Figura 2.2** estão expostas as etapas da formação de um biofilme (20). Nesta estrutura estão envolvidos diversos mecanismos de resistência como, uma menor penetração dos antibióticos devido a quelação por formação de complexos com os exopolissacarídeos ou por degradação enzimática do antibacteriano, trocas de material genético entre as células no biofilme, respostas de stress que auxiliam as bactérias não só a ultrapassar condições desafiantes para a sua sobrevivência (menor acesso a nutrientes, acumulação de produtos metabólicos tóxicos, exposição a agentes de sanitização, entre outros) incluindo a exposição aos antibióticos. Por outro lado, os biofilmes contêm células em diferentes fases de crescimento, particularmente, células na fase estacionária que têm suscetibilidade reduzida a diversos antimicrobianos que necessitam do metabolismo das células para exercer o seu efeito. Estes mecanismos de resistência estão exemplificados na **Figura 2.3**. Adicionalmente, podem ocorrer mutações que levam ao desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos, como o aumento da expressão de bombas de efluxo e a expressão de fatores de hibernação ribossômica (21–23).



**Figura 2.2** – Etapas da formação de um biofilme (Adaptado de (20)).

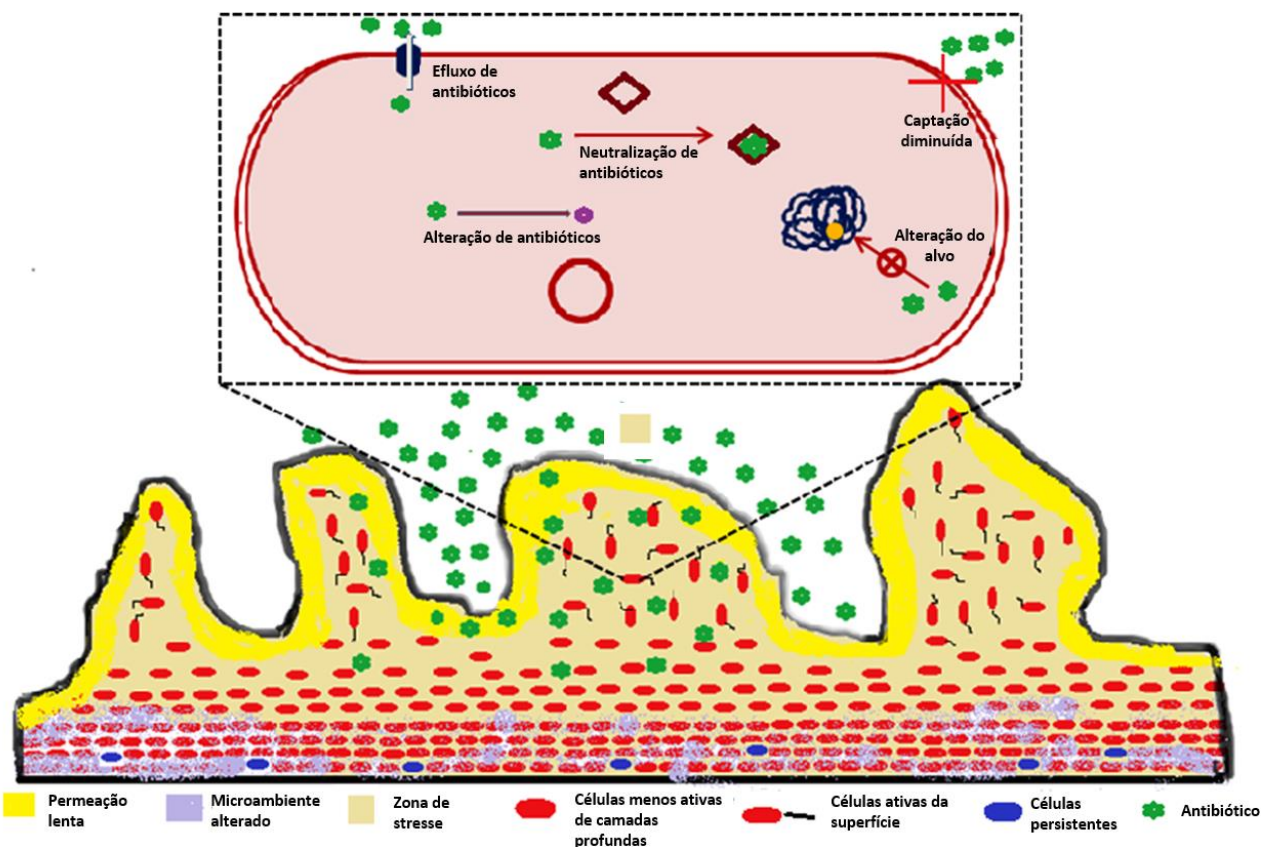


Figura 2.3 – Mecanismos de resistência observados em células em biofilme (Adaptado de (23))

### 2.1.2 Infecções por bactérias multirresistentes

As bactérias multirresistentes são consideradas um dos principais problemas de saúde pública. A multirresistência pode ser definida como uma ausência de suscetibilidade a pelo menos um fármaco em três ou mais classes de antibacterianos (2,24).

A rápida disseminação de bactérias multirresistentes em vários países é muito preocupante, visto que, em certos casos não existe tratamento alternativo disponível. A disseminação destas bactérias é facilitada devido à existência de inúmeros reservatórios naturais, como a água, o solo, as águas residuais, as plantas (frutas e vegetais), pecuária; produtos lácteos, o trato gastrointestinal, o sistema respiratório, e a pele de humanos e de animais (2).

O acrônimo ESKAPE descreve o grupo de bactérias, como *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter spp.*. Estas bactérias são uma das causas mais comuns das infecções hospitalares, nomeadamente em doentes em estado crítico e nos doentes imunodeprimidos. Para além disto, este grupo é caracterizado por possuir diversos mecanismos de resistência contra fármacos (25). A bactéria *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi descrita pela primeira vez em 1961 na Inglaterra, pouco tempo após a introdução da meticilina na prática clínica (26). As bactérias deste grupo apresentam elementos genéticos móveis que codificam para os genes *mecA* e *mecC*, que conferem resistência à meticilina e, conseqüentemente, a outros antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos (27,28). O medicamento de 1.<sup>a</sup> linha para o tratamento de

infecções provocadas por MRSA é a vancomicina, no entanto, já são reportados casos de resistência a este antibiótico (27–29). Isto leva a graves consequências, dado que, esta bactéria pode causar infecções da pele e dos tecidos moles, pneumonia e bacteriemia (28,30). A bacteriemia provocada por MRSA está associada a diversos efeitos adversos para a saúde do doente, como a pericardite (28). Diversos estudos reportaram que indivíduos com infecções sistêmicas causadas por MRSA apresentam uma baixa probabilidade de sobrevivência a longo prazo, bem como podem ocorrer sequelas após infecções por MRSA (28,31,32).

A infecção pela bactéria *Clostridioides difficile* normalmente ocorre devido à transmissão de endósporos, sendo estes resistentes ao calor, ácidos e antibióticos (33). A principal barreira contra *C. difficile* é a microbiota intestinal comensal (33). É estimado que esta bactéria é responsável por cerca de 500 milhões de infecções anuais nos Estados Unidos da América (EUA) (34). O uso de antibióticos é o principal fator de risco para o desenvolvimento da infecção por *C. difficile*, devido à perturbação que estes fármacos provocam na microbiota intestinal o que permite a proliferação e colonização por *C. difficile* (33,35). As infecções por *C. difficile* podem provocar diarreia leve a moderada e até mesmo colite fulminante, adicionalmente, podem ocorrer recidivas das infecções mesmo após a conclusão do tratamento, em particular em indivíduos imunodeprimidos. São reportados casos de multirresistência em *C. difficile*, como a resistência à clindamicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrólidos, cefalosporinas, penicilinas e até mesmo à vancomicina e fidaxomicina utilizadas para o tratamento destas infecções (33,35,36).

A bactéria *K. pneumoniae* é a causadora de uma das principais infecções hospitalares e infecções associadas à prestação de cuidados de saúde: Esta bactéria é responsável por patologias como a pneumonia, infecções na corrente sanguínea e infecções em recém-nascidos e doentes que se encontram em unidades de cuidados intensivos (37). A colistina é o antibiótico de último recurso utilizado para o tratamento de infecções provocadas por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (como as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*), no entanto, tem-se verificado a resistência por parte destas bactérias o que constitui um sério problema para o tratamento eficaz destas infecções (37,38).

O tratamento empírico para infecções provocadas por bactérias multirresistentes é ineficaz o que retarda a administração de antibioterapia adequada e, por outro lado, este fenómeno reduz as opções de tratamento disponíveis. Estes fatores contribuem para a morbimortalidade dos doentes afetados por estes microrganismos. (24).

### **2.1.3 Impacto das resistências na realização de procedimentos médicos**

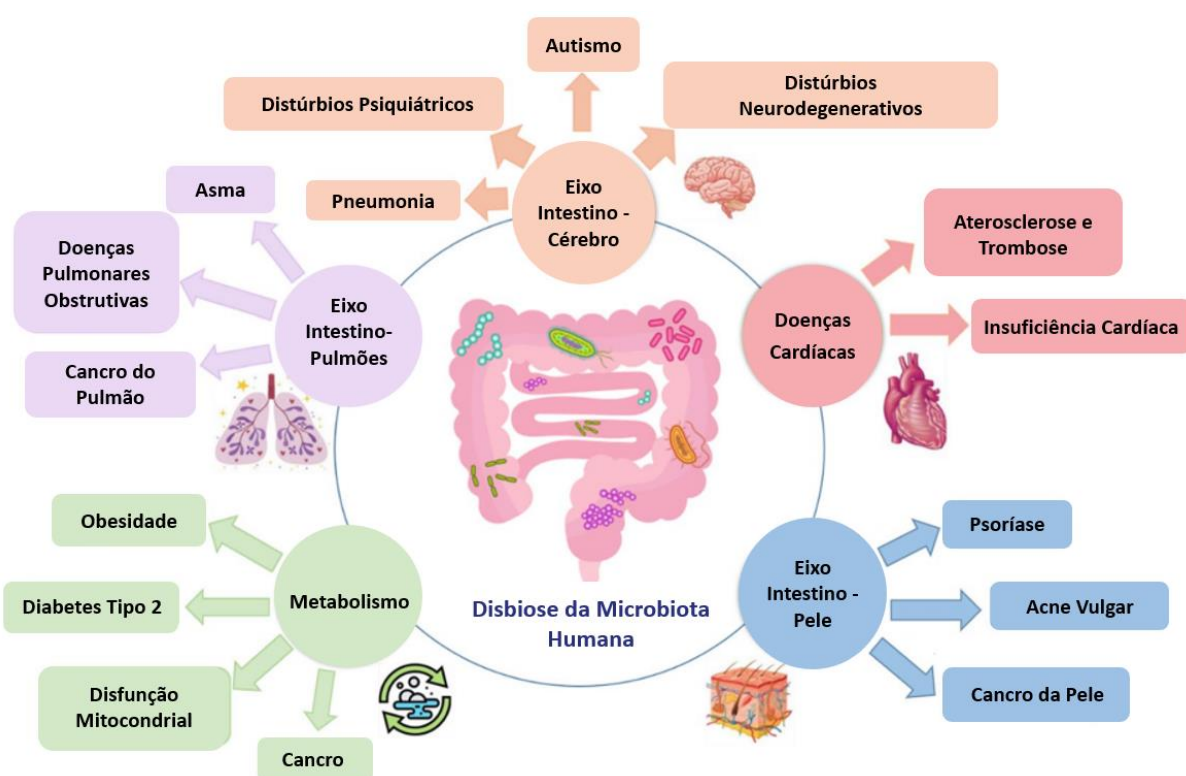
Uma das consequências da resistência aos antibióticos está diretamente relacionada com a dificuldade na realização de determinadas intervenções médicas como, cirurgias, quimioterapia, cesarianas e transplante de órgãos, visto que, existe o risco elevado de infecções com alternativas terapêuticas muito limitadas (37,39). Por exemplo, no caso da substituição total do quadril onde são utilizados antibióticos como profilaxia foi demonstrado que sem a utilização de antibióticos eficazes, 30 a 40% dos doentes pode desenvolver uma infecção pós-operatória (40,41). Adicionalmente, a taxa de mortalidade é de 30 % para os doentes infetados (42).

No transplante de células estaminais hematopoiéticas uma das principais causas de morbi-mortalidade são as infeções da corrente sanguínea, para evitar estas infeções são administradas fluoroquinolonas de modo profilático, no entanto, são detetadas resistências a estes fármacos em 81% das bactérias Gram-positivas e 74% das bactérias Gram-negativas. Adicionalmente, as infeções por bactérias multirresistentes devido à falta de fármacos eficientes e devido ao aumento da mortalidade são extremamente preocupantes (43).

#### 2.1.4 Consequências para a microbiota intestinal humana

Os antibióticos ao atuarem nas bactérias patogénicas acabam igualmente por afetar as características genómicas das bactérias comensais presentes no ser humano, conhecido como o microbioma humano (44).

A microbiota intestinal humana é constituída por bactérias, vírus e fungos, interagindo em simbiose com o seu hospedeiro. Estes microrganismos desempenham funções essenciais para o desenvolvimento do sistema imunitário, previnem a colonização por microrganismos patogénicos, estão envolvidos na homeostase de energia, e fornecem nutrientes essenciais e metabolitos bioativos. Adicionalmente, a microbiota está envolvida na homeostase local do trato gastrointestinal e homeostase sistémica do cérebro e pulmões. Paralelamente, a disbiose intestinal tem uma função importante na evolução de diversas doenças devido às conexões entre os órgãos, como os eixos intestino-cérebro e intestino-pulmões ilustrados na **Figura 2.4** (45).



**Figura 2.4** – Disbiose da microbiota humana e o seu efeito nos diversos órgãos (Adaptado de (45)).

A diversidade da microbiota é facilmente alterada por fatores endógenos e exógenos, como a alimentação, estado de saúde, higiene, fármacos e por microrganismos presentes no ambiente. As alterações neste equilíbrio provocadas por antibióticos podem causar ou agravar doenças, visto que, ocorre uma redução na diversidade microbiana e mudanças nos atributos funcionais da microbiota e, para além disto, ocorre o desenvolvimento e seleção de estirpes bacterianas resistentes deixando o hospedeiro mais suscetível a infeções por agentes patogénicos como, por exemplo, a bactéria *C. difficile* que provoca a colite pseudomembranosa e diarreia (45–48).

A resposta da microbiota aos antibacterianos depende de vários fatores, como a composição da própria microbiota (espécies, diversidade funcional) e o tipo de dieta e o impacto da perturbação exercida pelo antibiótico (espectro de ação, via de administração e duração da terapêutica). A disbiose provocada pelos antibacterianos altera a interação da microbiota com o hospedeiro, mas também favorece a transferência horizontal de genes de resistência promovendo a evolução e disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos (48). A exposição a estes fármacos, está igualmente associada a um maior risco para diversas doenças, como a obesidade, doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 2, dermatite atópica, doença celíaca, alergias e asma, sendo que, o risco aparenta ser superior para crianças mais novas (44,46).

Em relação à obesidade e a sua relação com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 é reconhecido que as bactérias intestinais e os seus metabolitos podem influenciar o ganho de peso e a deposição de gordura através da influência das hormonas intestinais modificando o apetite e a saciedade; regulação da ação da insulina e metabolismo da glicose; aumento da absorção de energia por parte do hospedeiro através da fermentação de alimentos com a produção de ácidos gordos de cadeia curta como o butirato, propionato e lactato, ocorrendo ainda um aumento da inflamação de baixo grau pela acumulação de lipopolissacarídeos (49–51). Desta forma, a obesidade está relacionada com uma disrupção da microbiota intestinal (disbiose), especialmente no início da vida pós-natal onde a microbiota intestinal ainda se encontra em desenvolvimento e é fortemente influenciada por fatores, como a idade gestacional, nutrição, tipo de parto e terapêutica com antibióticos (52). Efetivamente, foi reportado que a utilização de antibióticos em bebés com idade inferior a um ano estava associada a um aumento significativo do risco de excesso de peso e de obesidade entre os 9 e 12 anos, curiosamente este efeito apenas foi observado em rapazes (53).

As intervenções odontológicas requerem igualmente a utilização de antibióticos, o que pode proporcionar o desenvolvimento ou mesmo o aumento do número de estirpes resistentes presentes na cavidade oral, com a conseqüente diminuição de bactérias não patogénicas, possibilitando o desenvolvimento de inflamações e infeções sistémicas (47).

### **2.1.5 Impacto nas mitocôndrias**

O tratamento com antibióticos leva a diversos efeitos adversos, sendo um deles a disfunção mitocondrial. Os antibacterianos com ação bactericida, mas não bacteriostática podem provocar *stress* oxidativo e danos nas células dos mamíferos. A morte celular pode

ocorrer devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio devido à interrupção do ciclo do ácido tricarbóxico e da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (54).

O dano oxidativo provocado nas células pode ser responsável pelos efeitos adversos associados ao uso prolongado de antibióticos, como ototoxicidade, tendinopatia e nefrotoxicidade. Para além disto, diversos antibacterianos podem agravar a condição de um indivíduo que apresenta polimorfismos no ADN mitocondrial. Por exemplo, os aminoglicosídeos podem levar à perda de audição em doentes que têm o polimorfismo no gene *12S rRNA* (54).

## **2.2 Impacto do uso excessivo de antibióticos em animais**

### **2.2.1 Consequências do uso excessivo de antibióticos na pecuária**

O crescimento da população humana exige um maior aporte de alimentos, mais especificamente proteína animal. Deste modo, os antibióticos são um componente indispensável na veterinária e agropecuária, de facto, na União Europeia (UE), cerca de 8046 toneladas de antibióticos de uso veterinário foram consumidos em 2012 e, nos EUA, cerca de 80 % destes medicamentos são vendidos para uso em pecuária e aquacultura. Segundo a OMS, o uso destes fármacos em animais pode ser classificado em três categorias: uso terapêutico, prevenção de doenças e promoção de crescimento (55,56).

A utilização com finalidade terapêutica refere-se ao uso destes medicamentos para o tratamento de animais diagnosticados com alguma doença infecciosa. A prevenção de doenças consiste na utilização de antibacterianos em animais saudáveis em risco de desenvolverem infeções ou para o controlo da disseminação de uma doença de um animal infetado para outro do mesmo grupo, onde se inclui a profilaxia e a metafilaxia, respetivamente. Na promoção de crescimento, esta classe terapêutica é frequentemente utilizada em doses subterapêuticas para aumentar a taxa de ganho de peso (55,56).

As classes de antibióticos comumente utilizados em humanos também são utilizados em animais de pecuária, onde as tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos e macrólidos são os grupos mais usados para fins veterinários e como aditivos para a alimentação animal. Apenas 37 % dos agentes antibacterianos utilizados na indústria animal não têm análogos para o uso humano. O uso generalizado destes fármacos pode contribuir para o desenvolvimento de resistências aos antibióticos que são geralmente usados na medicina humana (56–58).

Os grupos de antibióticos mais utilizados como promotores de crescimento são os macrólidos, aminoglicosídeos e cefalosporinas de 3.<sup>a</sup> geração, no entanto, as doses utilizadas para este propósito são abaixo das doses terapêuticas e esta exposição constante a concentrações baixas dá origem a uma rápida formação e dispersão de estirpes resistentes a estes agentes. Adicionalmente, o uso destes medicamentos em quantidades sub-inibitórias contribui para a disseminação de genes de resistência a antibióticos (ARG), visto que, estas concentrações desestabilizam o genoma bacteriano o que pode levar a um aumento da virulência e/ou a um aumento da disseminação de material genético associado à resistência. Por outro lado, é criada uma pressão seletiva para a propagação de bactérias patogénicas e bactérias comensais resistentes na microbiota intestinal dos animais, devido à competição com as estirpes não resistentes. (56,59).

Pouco tempo após o uso difundido de antibacterianos como promotores de crescimento para a produção animal, na década de 1950, surgiram inúmeras notificações de surtos devido a bactérias resistentes em humanos e em animais de criação em diversos países. Na UE, em 2006, foi excluída a utilização de antibióticos na ração animal. No entanto, em países como a China, Rússia e Índia ainda é permitida a utilização desta classe terapêutica para este fim (59).

O uso generalizado e excessivo desta classe terapêutica levou à emergência de bactérias resistentes na pecuária que podem ser transmitidos e causar doenças em humanos, como a bactéria *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (55,59,60).

As bactérias resistentes que se encontram nestes animais podem igualmente ser transmitidas diretamente aos humanos através do consumo de alimentos contaminados (carne, peixe, ovos e laticínios), sendo que, já foram registados vários surtos de infeções de origem alimentar provocados por estirpes resistentes de *E. coli* e *Salmonella* spp.. Em adição, a transmissão de estirpes resistentes entre hospedeiros diferentes pode ocorrer através do contacto direto entre pessoas e animais, do contacto com substâncias fisiológicas que contenham bactérias (sangue, saliva, fezes, etc.) ou através do ambiente circundante (água, ar ou forragem contaminados) (56,58).

Vários estudos demonstraram que os animais, no âmbito da pecuária são reservatórios de ARB e que, estes podem ser encontrados em carne e laticínios contaminados (61–63). Deste modo, existe o risco de que ARG de bactérias de origem zoonótica possam ser integrados no microbioma humano através de transferência horizontal de genes. Indivíduos com contacto frequente com animais de criação, como trabalhadores agrícolas, têm um risco mais elevado de adquirirem ARB, por exemplo, foram obtidos isolados de MRSA em humanos que estavam diretamente relacionados com o tempo despendido em quintas de criação de animais (56).

Os antibacterianos que são administrados aos animais não são facilmente degradados sendo excretados na urina e fezes. Isto depende da farmacocinética e das propriedades físico-químicas dos fármacos, da capacidade do animal em transformar estes fármacos e da idade do animal (64,65). Sendo que, 58 % destes fármacos são introduzidos no agroecossistema através da aplicação de estrume animal no solo, bio sólidos, lodo de esgoto ou sedimentos, rega com água subterrânea contaminada ou, mesmo movimento aéreo de plantas. Deste modo, os alimentos que são geralmente consumidos crus podem constituir uma fonte de ARB que acabam por se integrar no microbioma humano (59,66).

O surgimento de resistências nos microrganismos patogénicos de origem animal tem como consequência a falha terapêutica o que, naturalmente, tem um efeito negativo na saúde e bem-estar animal. Adicionalmente, este fenómeno tem impacto económico devido ao aumento da mortalidade animal e, indiretamente, diminuição da conversão alimentar e diminuição da produção e crescimento. A redução dos antibióticos disponíveis é pois evidente, por exemplo, a penicilina que tem sido usada para o tratamento de mastite provocada por *S. aureus* no gado desde a década de 1950, mas atualmente devido à resistência à penicilina esta não é indicada como tratamento de 1.ª linha (57,60).

Como foi mencionado acima o crescimento populacional exige um aumento na produção animal o que leva a um aumento no uso de antibacterianos. Segundo algumas previsões, globalmente, o uso de antimicrobianos na indústria pecuária pode aumentar 67 % até 2030 e, 99 % em países como a China, Rússia, Índia, Brasil e África do Sul. Deste modo, é importante a implementação de medidas para diminuir o impacto deste fenómeno (56).

### **2.2.2 Consequências do uso abusivo de antibióticos na aquacultura**

A aquacultura cresceu globalmente como uma das principais indústrias, contudo, as doenças infecciosas constituem um grave problema. Neste setor são utilizados antibacterianos para prevenir e tratar infeções em peixes e invertebrados. Só no Reino Unido, foram utilizadas 2 toneladas de antibióticos na produção de peixe. Os métodos de criação de peixe com grande densidade populacional, falta de barreiras sanitárias, aglomeração de piscicultura em águas costeiras e falta de isolamento de animais infetados, proporciona um ambiente propício para a rápida disseminação de infeções bacterianas (67).

Os antibióticos podem ser administrados por via oral, como banhos e injeções para prevenir e tratar doenças que ocorrem em aquacultura, e alguns são usados como promotores de crescimento. Porém, estes medicamentos também podem causar problemas no meio aquático (67,68).

Os resíduos desta classe terapêutica em produtos aquáticos podem representar um risco para a saúde humana, como toxicidade, alergias e resistência a estes medicamentos. O uso de antibióticos de 1.ª linha na aquacultura pode levar a resistências a fármacos essenciais para a medicina humana. A administração por via oral e em banhos deve ser evitada, visto que, vai afetar não só os organismos aquáticos, mas também o meio aquático (68).

Cerca de 80% dos antibacterianos administrados são excretados na urina e nas fezes sem decomposição completa. As fezes e o alimento não consumido podem sedimentar-se no fundo dos compartimentos de crescimento e contribuir para a resistência, adicionalmente, os antibióticos não metabolizados podem ser transportados para locais distantes contribuindo para a disseminação de ARB e ARG (67,68).

As concentrações residuais de medicamentos dependem das espécies e dos tecidos e a sua absorção ocorre maioritariamente através da pele, guelras e ingestão de alimento contaminado. Além disso, observou-se que a concentração de antibióticos é superior em peixes carnívoros em comparação com peixes omnívoros ou herbívoros. A presença de resíduos destes agentes terapêuticos em peixes e marisco pode levar à toxicidade e alergias em consumidores. Adicionalmente, estes fármacos podem entrar em contacto direto com a pele, trato respiratório e trato gastrointestinal em pessoas que aplicam estes fármacos ou que tenham contacto com ração contendo antibióticos e, igualmente em pessoas que transportam e vendem estes produtos aquáticos, provocando alergias e envenenamento (67,68).

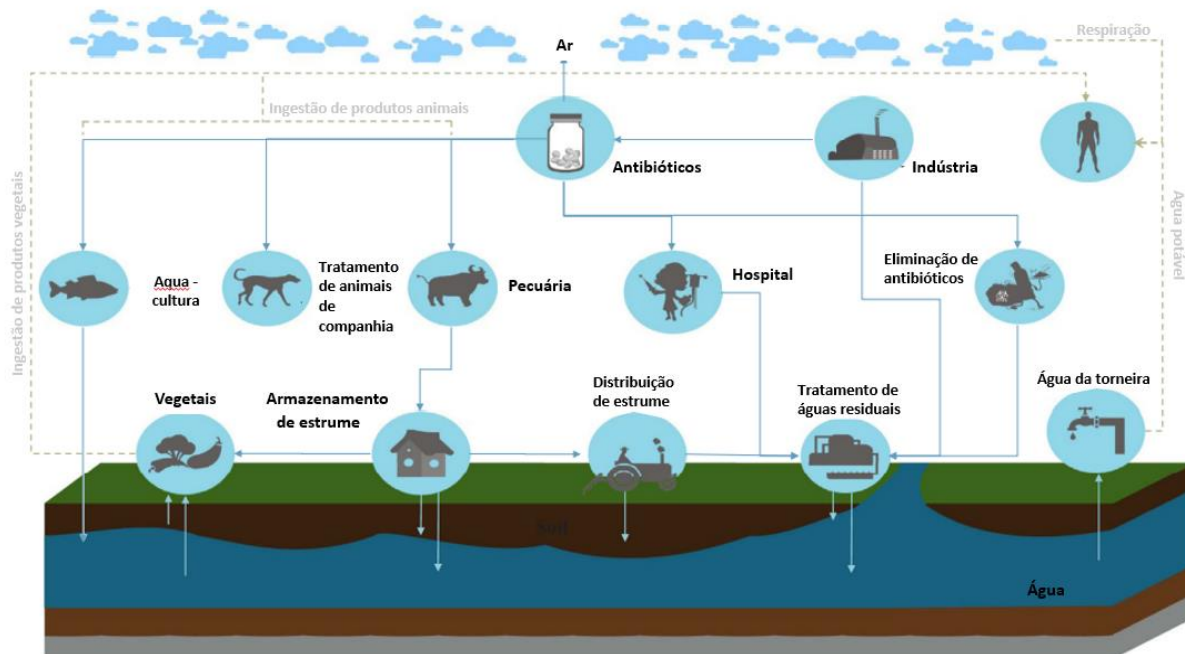
A exposição a longo-prazo a esta classe pode levar a esteatose através da alteração dos genes relacionados ao metabolismo e transporte dos lípidos. Por outro lado, podem também causar toxicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, supressão da medula óssea e desequilíbrio da microbiota intestinal (68).

A resistência a estes fármacos pode ser transferida dos organismos aquáticos para os humanos, o que pode levar a um aumento no número de infecções por bactérias resistentes, e, conseqüentemente, a um aumento na frequência de falha do tratamento com antibióticos e no aumento da gravidade das infecções, visto que, a resistência leva a um prolongamento da duração da doença, aumento das hospitalizações e mortalidade (68).

### 3. Impacto dos antibióticos no meio ambiente

O uso de antibióticos na agricultura, medicina humana e veterinária está ligado à contaminação de vários compartimentos do meio ambiente, como o solo, plantas, águas superficiais, água potável e águas residuais. A importância deste fenômeno para a saúde global parte do princípio da possibilidade da ingestão dos resíduos de antibióticos, poder alterar o microbioma humano e levar à proliferação seletiva de espécies resistentes, por outro lado, também pode ocorrer a criação de pressão seletiva no microbioma do meio ambiente e levar à criação de reservatórios de resistência a estes fármacos no ambiente. A **Figura 3.1** ilustra as diferentes vias pelo qual os humanos podem ser expostos aos resíduos desta classe terapêutica (69,70).

Neste capítulo vão ser exploradas as causas e consequências da contaminação do meio ambiente com estes agentes terapêuticos.



**Figura 3.1** – Vias de exposição humana aos resíduos de antibióticos, como via ingestão de produtos vegetais e animais e via água potável (Adaptado de (70)).

#### 3.1 Impacto dos antibióticos no solo e nas plantas

A introdução de antibacterianos e os seus resíduos no solo pode ocorrer por diferentes vias, como a aplicação de estrume, irrigação com água reutilizada, águas residuais, biossólidos e lama de aterros sanitários. Isto ocorre porque a maioria dos antibióticos não são completamente metabolizados pelos organismos, quer humanos quer animais, desta forma, uma elevada percentagem destes medicamentos é libertada para a água e solo. No entanto, a concentração de resíduos destes fármacos nas lamas de depuração, estrume, biossólidos e no solo depende da classe dos antibióticos, metabolismo animal, duração do tratamento e o tempo de amostragem em relação ao período de tratamento (66,70,71).

As concentrações no solo de determinados antibióticos variam entre alguns nanogramas até miligramas por quilograma de solo, sendo que, as concentrações mais elevadas são observadas em áreas previamente tratadas com estrume ou usadas para pecuária. Por exemplo, no Norte da China, observaram-se níveis residuais de tetraciclina no solo superiores a sulfonamidas e quinolonas, em que a concentração mais elevada (11,0 mg/kg) de clorotetraciclina foi detectada em solos tratados com estrume (70,71).

O comportamento dos antibacterianos quando são libertados para o ambiente vai depender das suas propriedades físico-químicas (solubilidade aquosa, volatilidade, lipofilia, adsorção e capacidade de fixação) e também vai depender das condições climáticas e das características do solo (valor de pH, conteúdo em matéria orgânica e força iónica). Outros fatores que podem influenciar este comportamento são as alterações de origem microbiana, lixiviação, escoamento superficial e absorção por parte de plantas (66).

O principal processo que determina a dispersão destes fármacos no meio ambiente é a lixiviação, que também determina a disponibilidade destes agentes terapêuticos para serem absorvidos pelas plantas, visto que, a absorção destes agentes, mesmo sendo em quantidade reduzida, pode levar a efeitos fitotóxicos (66).

Desde a década de 1950, que os antibacterianos são utilizados para o controlo de infeções bacterianas em plantas como frutas, vegetais e até plantas ornamentais. Na China, estima-se que, anualmente, são produzidos 80 milhões de quilos de antibióticos, fungicidas e inseticidas para a utilização em campos de cultivo. A absorção e efeito destes agentes terapêuticos depende do fármaco, da espécie de planta e das características do solo e da água. Diversos estudos, demonstraram efeitos tóxicos destes agentes em plantas como cenouras, alface, pepinos, arroz, alfafa e azevém (72).

A origem bacteriana dos cloroplastos pode explicar a razão da toxicidade dos antibacterianos. Vários estudos demonstraram que, no musgo *Physcomitrella patens* e na alga *Closterium*, a fosfomicina, cicloserina e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos levam à inibição da divisão dos cloroplastos e da divisão celular e levam à morte celular. Num outro estudo, as tetraciclina e cloranfenicol levaram à inibição da fotossíntese, por outro lado, as tetraciclina também provocaram alterações cromossómicas, inibição do crescimento das plantas, redução dos pigmentos como o caroteno e a clorofila. Adicionalmente, foi observado que a clorotetraciclina provocou uma diminuição de cálcio intracelular devido à quelação, o que, por sua vez altera a síntese proteica e induz efeitos tóxicos. Deste modo, os antibióticos que se encontram no solo podem atrasar a germinação ou reduzir a biomassa o que, consequentemente, afeta negativamente a produção nas terras agrícolas (69,72).

A presença de elevadas concentrações destes agentes terapêuticos no solo vai levar à proliferação preferencial de bactérias resistentes e, subsequentemente, leva a alterações na sensibilidade a estes fármacos em toda a população bacteriana. Alternativamente, em concentrações abaixo da concentração mínima inibitória ocorrem alterações genéticas no genoma bacteriano e transferência de ARG e de elementos genéticos móveis (como plasmídeos, transposões e integrões). Adicionalmente, a co-seleção e expressão de genes de resistência nestes elementos genéticos móveis pode promover a disseminação de ARGs. Por

exemplo, em solos tratados com estrume, os genes que conferem resistência à minociclina, gentamicina, estreptomina, amicacina, rifampicina e cloranfenicol são responsáveis por cerca de 70 % dos ARGs totais (70,71).

Os microrganismos que se encontram no solo têm um papel vital em diversos processos e também na manutenção da qualidade e saúde do solo. Estas bactérias participam em sistemas como liberação de nutrientes, estabilização da estrutura da terra, rotatividade de matéria orgânica e garantem a fertilidade do solo. Em adição, muitos microrganismos funcionam como um “controle biológico” pela inibição do crescimento de agentes patogênicos (71).

Os antibióticos, não só afetam a abundância bacteriana do solo, mas também, afetam a atividade bacteriana, atividade enzimática, o ciclo do azoto e a mineralização do carbono. Devido à atividade antibacteriana destes fármacos pode ocorrer a inibição da proliferação das bactérias que se encontram normalmente no solo e, desta forma, influenciar a constituição da comunidade microbiana o que pode levar a alterações nos processos ecológicos do solo. Em solos que continham sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametazina e trimetoprim, observou-se que ocorria uma diminuição na respiração do solo, contudo, este efeito depende da permanência destes agentes neste meio. A taxa de nitrificação e de desnitrificação também é afetada por estes medicamentos, sendo que, as consequências são dependentes da categoria de antibiótico e da duração de exposição (71,73).

A atividade das enzimas como as desidrogenases, fosfatases e ureases também pode ser afetada. Observou-se que ocorria a inibição das desidrogenases e ureases em solos que continham 1 µg/kg de tetraciclinas. A inibição da atividade enzimática nos solos pode ainda estar relacionada com a inibição da proliferação ou morte de microrganismos sensíveis aos antibióticos aplicados (71).

Deste modo, a presença de antibacterianos no solo proporciona um ambiente ideal para o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes, transferência e desenvolvimento de genes de resistência e, também, contaminação de plantas que consumidas por humanos os microrganismos endófitos podem colonizar o hospedeiro e levar ao desenvolvimento de infecções de difícil tratamento (74).

### **3.2 Impacto dos antibióticos no meio aquático**

Os antibióticos podem atingir a água doce por três vias principais, i) efluentes de estações de tratamento de esgotos, ii) fábricas de produtos químicos e, iii) indústria animal e aquicultura. Adicionalmente, o aumento da densidade populacional, da atividade industrial e agrícola ao longo dos cursos de água doce proporciona a distribuição destes fármacos, bactérias resistentes e ARGs (66,75).

A presença de antibacterianos nas águas residuais pode ocorrer devido à sua excreção através das fezes e urina, eliminação inadequada destes agentes através dos esgotos domésticos e efluentes hospitalares. Nas estações de tratamento de esgotos estes medicamentos podem ser eliminados através da retenção nas lamas ou degradação biótica, ou abiótica. No entanto, esta degradação é muitas vezes incompleta e estes agentes, e os seus

metabólitos conseguem entrar no meio ambiente, como águas fluviais e atingir os solos pela utilização de água reutilizada e através das lamas (66,69,75).

A contaminação de corpos de água com esta classe terapêutica leva à disseminação de estirpes resistentes, troca genética de ARG das bactérias resistentes para as bactérias nativas do meio, o que acaba por alterar o microbioma do ecossistema aquático. A dispersão de antibióticos, ARB e ARG pode ainda ocorrer através de biofilmes, das vísceras dos animais aquáticos, o que irá igualmente afetar o ambiente marinho. Por outro lado, os resíduos destes medicamentos já foram detetados em água potável, sendo que, antibióticos como quinolonas, cloranfenicol, macrólidos e sulfonamidas são os principais agentes detetados. Deste modo, a água potável é outra via de disseminação destes fármacos, ARB e ARG (66,70).

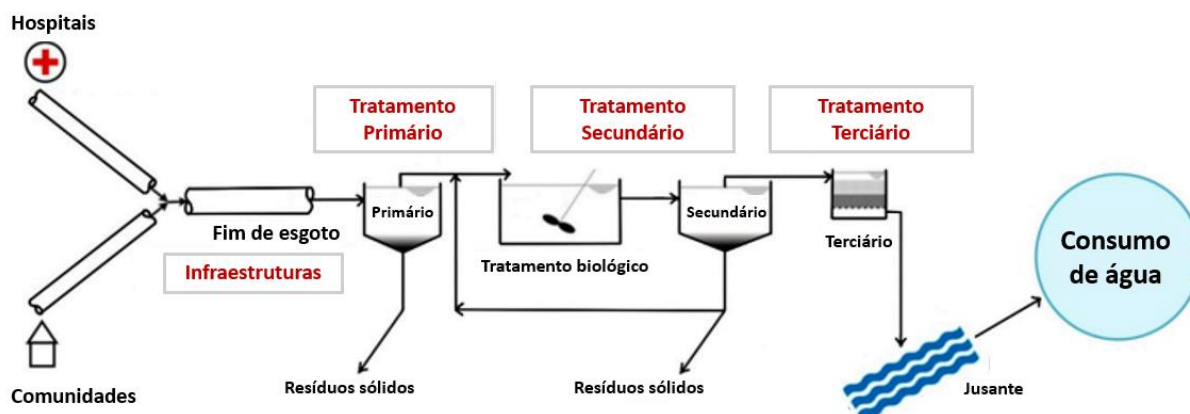
#### 4. Estratégias para a mitigação dos problemas no meio ambiente. O conceito de Saúde Global (One Health)

A presença de antibióticos e os seus resíduos no meio ambiente ocorre devido a diversos fatores, como a metabolização incompleta destes fármacos por humanos e animais sendo excretados para o ambiente; eliminação de agentes antibacterianos inutilizados e resíduos da indústria farmacêutica, resíduos domésticos e de estabelecimentos comerciais que poluem os resíduos urbanos. Por outro lado, a utilização de estrume e de águas residuais não tratadas como fertilizante nos campos de cultivo contribui para a introdução de antibióticos no solo e nas águas superficiais (76–78).

Deste modo, é importante investir em métodos e técnicas para diminuir e/ou eliminar antibióticos das águas residuais, do estrume e do próprio solo, de forma a atenuar as consequências para o meio ambiente.

##### 4.1 Técnicas de eliminação de antibióticos nos Sistemas de Tratamento de Efluentes

O tratamento de águas residuais é uma combinação de processos primários, secundários e terciários, exemplificados na **Figura 4.1**, sendo cada etapa constituída por processos físicos, químicos e biológicos diferentes. A maioria das estações de tratamento possuem o tratamento primário consistindo em filtração e sedimentação com o intuito de remover partículas sólidas dos efluentes. Por outro lado, no processo secundário pretende-se remover matéria orgânica através de processos biológicos e sistemas aeróbios e anaeróbios. Relativamente ao tratamento terciário, este é realizado como última etapa e envolve técnicas como o uso de cloro, radiação ultravioleta (UV) e ozonização para desinfetar as águas residuais e ainda pode ser realizada a precipitação de fósforo através de um filtro (76,79).



**Figura 4.1** – Processos de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais e locais onde pode ocorrer intervenções de mitigação da resistência aos antibióticos (Adaptado de (80)).

As estações de tratamento de esgotos são essenciais para as infraestruturas urbanas, sendo capazes de degradar compostos orgânicos, remover azoto e fósforo e reduzir a carga de microrganismos patogénicos. No entanto, os métodos tradicionais de tratamento de

efluentes não são eficazes na eliminação completa de agentes antibacterianos o que promove resistência aos antibióticos por parte das bactérias (77,79,81).

A eliminação de antibióticos por meio de tratamento biológico pode ocorrer de forma biótica, através da degradação bacteriana ou fúngica, e abiótica por hidrólise, adsorção e fotólise. Na adsorção de lamas de depuração a degradação ou transformação é o mecanismo principal na eliminação de antibióticos. Os resíduos de antibióticos com propriedades hidrofóbicas têm uma maior afinidade para os sólidos e, por isso, encontram-se concentrados nas lamas de depuração. No caso de resíduos com propriedades hidrofílicas, que se encontram concentrados em soluções aquosas, é necessário o emprego de técnicas como a formação de complexos com íons metálicos, permuta iônica e interações polares. Geralmente, os antibióticos encontram-se na fase aquosa das águas residuais devido às suas propriedades hidrofílicas e resistência aos tratamentos biológicos, desta forma, é necessário explorar outros processos onde seja possível a eliminação completa destes compostos (76).

Os tratamentos aeróbios e anaeróbios são sistemas que necessitam de pouca energia, são ecológicos e que podem ajudar na eliminação de ARB e ARG. O tratamento aeróbio ocorre na presença de oxigênio e de microrganismos que utilizam o oxigênio na conversão de poluentes orgânicos em dióxido de carbono, água e em biomassa. Relativamente ao tratamento anaeróbio, este ocorre num ambiente sem oxigênio e na presença de microrganismos que não necessitam deste elemento para a conversão de compostos orgânicos em dióxido de carbono, metano e biomassa. Estas técnicas necessitam de pouca energia, são ecológicas, simples, flexíveis e podem ajudar na eliminação de ARB e ARG (79,82). Num estudo, onde foram analisadas amostras de estações de tratamento de águas residuais municipais visando avaliar a variação em 5 ARG como, *tet(G)*; *tet(W)*; *tet(X)*; *sul(1)* e *intl(1)*, nos afluentes e efluentes após tratamento aeróbio, anaeróbio e com bioreator de membrana, os autores concluíram que o tratamento anaeróbio tem maior sucesso na remoção de ARG em comparação com o tratamento aeróbio, visto que, sob condições anaeróbias os microrganismos têm uma baixa atividade, o que leva a uma menor disseminação de genes de resistência aos antibióticos (82,83). Por outro lado, a diminuição de ARG nem sempre ocorre em maior quantidade no processo anaeróbio, como foi verificado em dois estudos onde foi reportado um aumento de ARG para a tetraciclina e eritromicina (78,84).

Os bioreatores de membrana são unidades de processamento que separam partículas segundo o tamanho das moléculas e afinidade destes compostos em relação à membrana de poros finos. Este sistema pode ser instalado em estações de tratamento de águas residuais e combinado com outros tipos de tratamento permitindo o funcionamento em meio aeróbio ou anaeróbio. Foi observada uma maior diminuição nos ARG após um tratamento final com o bioreator comparativamente com os passos anteriores que incluem processos aeróbios e anaeróbios(83,85). Este fenómeno ocorre devido à filtração adicional do efluente através da membrana permitindo uma maior eliminação de bactérias (83,85). Em adição, foi verificada uma eliminação de até 77,5% de antibióticos como ampicilina, eritromicina, ciprofloxcina e tetraciclina e uma diminuição de 94% de bactérias resistentes como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Aeromonas* e *Bacteroides* após o tratamento com bioreatores de membrana com um valor de poro de <0,4 µm (78,86). Alternativamente, bioreatores híbridos aeróbios-anaeróbios

consistem num pré-tratamento anaeróbio para diminuir a concentração de carbono seguido de um tratamento aeróbio que elimina resíduos orgânicos e reduz a concentração em amónia, observou-se que com este tipo de tratamento foram removidos 85% dos ARG do afluente tornando-o mais eficiente comparado com tratamento único aeróbio (83%) e anaeróbio (62%) (79,82,87).

A eficácia da redução de ARG nos tratamentos aeróbios e anaeróbios também depende das condições em que é operado o processo, a estação do ano e o tipo de ARG. Adicionalmente, vários estudos demonstraram que em processos anaeróbios uma temperatura entre 40 a 60°C aumenta em 89% a eliminação de genes de resistência aos macrólidos (88–90). Observou-se também que ocorre maior redução de ARG como *sull*; *sulll*; *tetC*; *tetG* e *tetX*, devido a um maior tempo de retenção das lamas (10 a 20 dias) e um valor de pH alcalino, mais especificamente, entre 9 e 11 (78,88). O valor de pH mais alcalino restringe a quantidade de plasmídeos que podem ser transferidos e, também restringe a sua capacidade de transformação, dificultando a disseminação de ARG. Referente aos processos aeróbios, a sua eficácia depende do *design* do reator, dos tempos de retenção hidráulicos e também o tipo de ARG, como exemplo foi observada uma diminuição de 85% dos genes *ermB*, *sull*, *tetA*, e *tetW* após um tempo de retenção hidráulico de 13 dias (78,91).

#### **4.1.1 Tratamento por Zonas Húmidas Construídas (ZHC)**

As zonas húmidas construídas consistem em ecossistemas artificiais baseados em lagoas rasas e leitos contendo vegetação típica de zonas húmidas naturais, que dependem de interações simples e complexas entre o substrato, as macrófitas e os microrganismos para o tratamento de efluentes. Esta é considerada uma técnica sustentável, com baixo custo, ecológica e fornece benefícios para o habitat da vida selvagem, aquacultura, recarga de aquíferos e controlo de inundações. Estes sistemas são adequados a locais descentralizados e a pequenas comunidades, onde são utilizados para o tratamento de efluentes domésticos, de pecuária e águas residuais municipais (78,92–95).

As zonas húmidas construídas (ZHC) são estruturas impermeáveis em canal preenchidas com substrato, cultivadas com plantas de zonas húmidas ou macrófitas onde ocorre a passagem de águas residuais (95). Diversos fatores afetam o rendimento deste tipo de tratamento como o oxigénio dissolvido, o valor de pH, a temperatura, a taxa de carga hidráulica, o tempo de retenção hidráulico, a diversidade de macrófitas, o substrato e a profundidade da água (92,95). Este tratamento pode ser subdividido, por um lado, relativamente ao escoamento do efluente, como escoamento superficial ou escoamento subsuperficial, sendo que no último caso pode ser caracterizado quando ao trajeto do fluxo (vertical ou horizontal). Por outro lado, também pode ser caracterizado relativamente às plantas utilizadas, como plantas emergentes, ou seja, plantas que possuem pedúnculos e folhas que emergem do lençol de água, plantas, flutuantes, de folha flutuante ou submersas (92,95). No estudo conduzido por Guan et al. (95) foi observada uma maior capacidade de degradar medicamentos numa zona húmida construída de modo subsuperficial em linha vertical em comparação com uma zona húmida construída em modo subsuperficial em linha

horizontal (95). Este fenómeno ocorre devido a uma maior frequência de contacto entre a interface sólida e líquida, o que leva a melhores condições de oxidação (96).

Este sistema tem a capacidade de reduzir o teor de azoto, a carência bioquímica de oxigénio, a carência química de oxigénio, fósforo e outros poluentes emergentes (78,97). Consoante os os poluentes que se pretende eliminar dos efluentes, as ZHC podem funcionar sob diferentes condições, como referido anteriormente podendo ser aplicados diferentes trajetos de fluxo, diversas macrófitas e substratos (78).

Dentro das ZHC existem diversos processos para a eliminação de antibióticos, como adsorção, absorção por parte das plantas, degradação microbiana, fitodegradação e fotodegradação, no entanto, a eliminação destes fármacos depende das características físicas e químicas dos antibióticos (93,98).

As macrófitas encontradas nestes sistemas têm um papel importante, dado que, influenciam os processos físicos, químicos e biológicos do tratamento. Estas plantas fornecem uma maior superfície, nutrientes e um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos, auxiliam na filtração de compostos em suspensão e impedem a formação de canais de erosão devido ao denso sistema radicular, o que protege e estabiliza o substrato. Em adição, o extenso sistema de raízes diminui a velocidade do fluxo dos efluentes, melhora a filtração e sedimentação, leva à criação de macroporos no solo, o que previne o entupimento e ajuda a manter a capacidade de infiltração. O mecanismo principal pelo qual ocorre a absorção de antibióticos por parte das plantas é através da difusão, que depende da concentração do agente antibacteriano, da hidrofobicidade e da solubilidade em água, adicionalmente, as plantas podem eliminar estes fármacos por adsorção ou fluxo de massa (95,98).

Em relação aos compostos lipofílicos, estes conseguem difundir-se através da bicamada lipídica da membrana plasmática e para os fluídos celulares e, conseqüentemente, conseguem translocar-se para as raízes das plantas, folhas e rebentos. Após a transpiração, os antibióticos podem ser degradados via fitodegradação. Neste tipo de mecanismo ocorre uma série de processos bioquímicos, como a transformação dos contaminantes, conjugação dos metabolitos e subsequente incorporação nas paredes celulares e nos vacúolos. Adicionalmente, o oxigénio pode ser transportado até às camadas mais profundas devido à extensa rede de raízes e rizomas dos macrófitos, o que estimula o crescimento de microrganismos aeróbios e resulta numa melhoria do processo de oxidação e degradação dos antibióticos (95,98). Foi demonstrado que as plantas têm a capacidade de acumular e degradar antibióticos, sendo que as raízes têm uma maior capacidade de bioacumulação relativamente aos caules e folhas (98,99). Por outro lado, as raízes têm outro papel essencial na degradação de antibióticos devido à secreção de compostos como ácido citrónico e derivados do ácido acrílico que se integram nas substâncias poliméricas extracelulares onde os microrganismos responsáveis pela degradação de antibióticos se encontram ancorados. Por exemplo, verificou-se que após a administração de exsudados radiculares artificiais, compostos por ácidos orgânicos de baixo peso molecular, aminoácidos e açúcar solúvel, ocorreu uma melhoria na capacidade de remoção de nutrientes na ZHC contaminada por

antibióticos que ocorre pelo aumento da reciclagem do azoto por parte das bactérias *Rhizobacter* spp. e *Rhizobium* spp. (98,100).

O substrato neste tipo de sistema apresenta duas funções principais, como providenciar o meio básico para o crescimento das plantas aquáticas e dos microrganismos e eliminar medicamentos através da adsorção e da degradação biológica (98,101). A adsorção dos poluentes ocorre através das forças de van der Waals, interações electrostáticas e permuta iónica. Os tipos de substrato utilizados são casca de arroz, casca de pinheiro, cortiça granulada, areia e gravilha, sendo estes dois últimos os mais frequentemente utilizados devido à sua elevada capacidade de adsorção (98,101). Foi reportada uma eliminação de 98% de sulfametoxazol numa ZHC contendo *P. australis* plantada em gravilha siliciosa e areia, neste caso o mecanismo principal de eliminação deste fármaco foi a adsorção ao substrato (98,102).

A degradação microbiana é também um processo importante para a degradação dos poluentes, sendo realizada por diversos grupos de microrganismos como bactérias autotróficas e heterotróficas, fungos do grupo dos *Basidiomicetes* e leveduras e ainda determinados protozoários (93,103). Neste caso a degradação dos antibióticos ocorre em condições aeróbias e anaeróbias e depende das características físico-químicas destes fármacos. Por exemplo, antibióticos com uma elevada solubilidade também apresentam uma melhor eficácia de degradação. Adicionalmente, a degradação por parte destes microrganismos também é afetada pelo tipo de substrato, concentração em nutrientes, taxa de carga hidráulica, temperatura e o conteúdo vegetal. Estes microrganismos apesar da exposição aos antibióticos conseguem resistir aos seus efeitos e degradar estes fármacos, nomeadamente foi observada a presença de estirpes bacterianas capazes de degradar antibióticos isolados de sedimento, lamas e águas residuais que podem auxiliar no processo das ZHC. Por exemplo, uma destas estirpes inclui *Labrys portucalensis* F11 capaz de degradar ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina (93,98).

A introdução de arejamento artificial no sistema de ZHC demonstrou um aumento na eficiência de eliminação de antibióticos, como o reportado para células de combustível microbianas onde ocorreu um aumento das percentagens de degradação de 4,98% e 4,34% para os antibióticos sulfametoxazol e tetraciclina, respetivamente após 12 horas de arejamento (98,104). Este efeito é devido a uma intensificação da atividade microbiana e uma maior oxidação destes fármacos devido ao arejamento artificial, o que promove uma maior eliminação de antibióticos, no entanto, o arejamento contínuo pode ser insustentável e tornar o processo bastante dispendioso (98).

Deste modo, nas zonas húmidas construídas ocorre um comportamento sinérgico entre as plantas aquáticas, o substrato e os microrganismos para a eliminação de poluentes, sendo cada fator influenciador para o aumento da eficácia da degradação dos antibióticos (98).

#### **4.1.2 Tratamento por Processos de Oxidação Avançados (POA)**

Os processos de oxidação avançados são métodos químicos baseados no uso de radicais hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) para a degradação de poluentes orgânicos e químicos, como antibióticos que podem ser modificados em moléculas mais

pequenas o que, conseqüentemente, pode diminuir o efeito destes fármacos nos microrganismos e aumentar a sua biodegradação e a taxa de eliminação. Os processos de oxidação avançados (POA) podem ser subdivididos em reação de Fenton, ozonização, fotocatalise e oxidação eletroquímica (78,101,105).

Na reação de Fenton é utilizado o reagente de Fenton que consiste numa combinação de sal ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e peróxido de oxigénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que ao ser adicionado às águas residuais reage e forma radicais hidroxilo. Deste modo, o funcionamento deste tipo de tratamento depende de vários fatores, como o valor de pH, a temperatura, a concentração em  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No caso do valor de pH, idealmente este deve-se manter à volta de 3 (105,106). Foi reportado que a oxidação com reagente de Fenton de antibióticos como amoxicilina, ampicilina e cloxacilina e após 60 minutos de reação, a carência química de oxigénio dos antibióticos presentes em águas residuais atingiu reduções de 49,0%, 57,7%, 81,5%, 76,9% e 75,6% para valores pH de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0, respetivamente (105,107). Desta forma, ocorreu maior decomposição destes fármacos com um valor de pH de 3,0 e foi observada uma diminuição da degradação para valores de pH superiores a 3,0, possivelmente devido à diminuição de ferro dissolvido (105,107). A concentração em peróxido de hidrogénio também é importante, visto que, é a fonte principal de radicais hidroxilo. Uma concentração baixa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  leva a uma menor quantidade de radicais e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição da capacidade de degradação, para além do mais, uma concentração excessiva deste elemento não é adequada para a degradação de poluentes. A concentração excessiva em  $\text{Fe}^{2+}$ , que funciona como catalisador da reação, leva ao sequestrar dos radicais e à inibição da degradação e implica um aumento dos custos do processo. Este processo tem diversas vantagens como uma elevada eficácia de degradação e fácil operação, no entanto, também apresenta desvantagens como a necessidade de manter um pH ácido e a produção de elevadas quantidades de lamas ricas em ferro que são difíceis de eliminar (105).

Na técnica de ozonização ou ozonização catalítica, o ozono, em condições ácidas ( $E(\text{O}_3/\text{O}_2) = 2.07 \text{ V}$ ), é capaz de oxidar diretamente uma variedade de poluentes orgânicos refratários e degradar microrganismos, ARG e ARB. Adicionalmente, esta molécula é capaz de reagir com água e com um catalisador e formar radicais hidroxilo (79,105). A ozonização pode ser subdivida em catalítica homogénea e catalítica heterogénea. Na ozonização catalítica homogénea, são utilizados catalisadores líquidos, mais especificamente os iões de metais de transição, como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  numa solução. Estes catalisadores têm como objetivo passar o ozono para o estado excitado e levar à produção de  $\bullet\text{OH}$  e melhorar a eficácia da degradação dos poluentes. Na técnica de ozonização catalítica heterogénea são utilizados catalisadores sólidos, como óxidos de metais e carvão ativado na solução de reação (105).

O tratamento por ozonização depende de vários parâmetros, como a concentração em ozono, o valor do pH e a mineralização dos contaminantes (105). A concentração em ozono é importante, dado que, a taxa de transferência de massa e o coeficiente de transferência de massa volumétrica aumentam com o aumento da concentração deste elemento. Deste modo, ocorre uma maior absorção de ozono que depois pode reagir com as moléculas de antibiótico e aumentar a sua degradação. A influência da concentração de ozono na decomposição de

antibióticos foi analisada para o antibiótico, tetraciclina, tendo este sido degradado mais rapidamente após uma exposição de 7 ppm de ozono, comparativamente com a exposição de 3 ppm (105,108). Foi confirmado que com o aumento da dosagem de ozono ocorre um aumento da eliminação dos antibióticos como, a ampicilina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, ofloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim (105,109). Em meio ácido o ozono consegue degradar os poluentes por oxidação direta, no entanto, em meio alcalino os poluentes são oxidados pelo ozono e pelos radicais hidroxilo (105). A degradação do cloranfenicol pelo ozono em condições de pH diferentes atingiu uma eficácia de eliminação de  $41,4 \pm 1,0\%$  e  $5,3 \pm 3,0\%$  para valores de pH de 2,0 e 8,0, respetivamente (105,110). Deste modo, o aumento da degradação num meio alcalino pode ser atribuído ao aumento da produção de radicais livres (105). Durante este processo pode não ocorrer a mineralização completa dos antibióticos, dado que, ocorre a formação de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) durante a degradação de antibióticos que atuam como sequestradores de radicais hidroxilo o que, consequentemente, pode inibir a eliminação destes fármacos antibacterianos. Adicionalmente, durante a ozonização ocorre a diminuição do valor de pH que, como foi visto anteriormente, não é favorável à produção de radicais, levando a uma degradação menos eficaz de antibacterianos (105).

A técnica de ozonização pode ser utilizada para melhorar a biodegradabilidade dos antibióticos através da produção de compostos intermediários biodegradáveis e com baixo peso molecular, onde a razão BOD5/COD é utilizada para caracterizar a biodegradabilidade de um poluente ou das águas residuais (105). Foi observado que a um valor de pH de 9 ocorre um aumento da razão BOD5/COD de 0 para 0,41 após 120 minutos de ozonização das águas residuais contendo ampicilina, deste modo, ocorre um aumento da biodegradabilidade do fármaco após a aplicação desta técnica (105,111).

A oxidação fotocatalítica consiste na utilização de materiais semicondutores, como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{WO}_3$  e  $\text{SnO}_2$  que atuam como fotocatalisadores. Estes materiais ao absorverem energia geram cargas negativas com capacidade redutora e cargas positivas com capacidade oxidativa. A ação redutora das cargas negativas pode levar à redução do  $\text{O}_2$  dando origem a radicais superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Por outro lado, as cargas positivas migram para a superfície do material semicondutor e levam à oxidação de  $\text{H}_2\text{O}$  dando origem ao radical hidroxilo. Deste forma, os poluentes são degradados por duas moléculas, pelos radicais superóxido e pelos radicais hidroxilo (105).

O tratamento por oxidação fotocatalítica depende de fatores como o tipo de material fotocatalítico utilizado, o valor de pH, a dosagem do catalisador e a estabilidade do catalisador. Os fotocatalisadores utilizados podem incluir óxidos de metais, como  $\text{TiO}_2$  e  $\text{ZnO}$ ; sulfetos de metais, como  $\text{CdS}$ ; semicondutores de metais preciosos, como  $\text{Ag}_3\text{O}_4$ ,  $\text{BiOBr}$ ,  $\text{BiOCl}$ ,  $\text{BiVO}_4$ ,  $\text{GdVO}_4$  e  $\text{SmVO}_4$  e materiais semicondutores não-metálicos como  $\text{g-C}_3\text{N}_4$  (105). O dióxido de titânio é o material mais vulgarmente utilizado devido à sua elevada atividade fotocatalítica, baixa toxicidade e estabilidade, como também devido à sua capacidade em degradar poluentes orgânicos como os antibióticos, mais especificamente a levofloxacina, oxitetraciclina, tetraciclina e ciprofloxacina (105,112,113). Adicionalmente, o óxido de zinco é um bom candidato como material devido à sua elevada capacidade de degradação de

contaminantes como ciprofloxacina, norfloxacina, cefixima e tetraciclina, e tem como vantagens o seu baixo custo, baixa toxicidade, alto potencial redox e valor ecológico (105). O valor de pH é outro fator que influencia este tipo de tratamento onde podem surgir cargas diferentes na superfície do catalisador dependendo de quanto maior ou menor for o valor de pH comparativamente ao potencial de carga zero dos catalisadores (105). Em adição, se o valor de pH for maior ou menor relativamente á constante de dissociação ( $pK_a$ ) dos substratos, o estado energético dos substratos é alterado (105). A utilização do UV-A/ $TiO_2$  como fotocatalisador para degradar amoxicilina, provocou a sua degradação sem apresentar alterações a valores de pH 5,0 e 7,5, no entanto, a mineralização deste fármaco diminuiu de 95% para 75% com o aumento do valor de pH de 5 para 7,5 (105,114). Adicionalmente foi reportado que o  $TiO_2$  e ZnO em solução aquosa e sob radiação solar no processo de degradação da cefotaxima são obtidos resultados semelhantes para ambos os catalisadores, onde a taxa de eliminação do antibiótico aumenta com o aumento do valor de pH de 4,2 para 6,2 e diminui com o aumento dos valores de pH de 6,2 para 7,6 (105,115).

A dosagem de fotocatalisador utilizada neste processo também vai influenciar a oxidação, onde um aumento da dose leva a um aumento na quantidade dos locais de reação e, conseqüentemente, vai melhorar a eficácia da oxidação e mineralização dos poluentes (105). No entanto, uma dose excessiva destes fotocatalisadores pode levar ao bloqueio da penetração dos fotões e à perda de energia luminosa através da reflexão e dispersão da luz por partículas sólidas. Foi reportado o efeito da degradação catalítica da tetraciclina após variações das dosagens de MWCNT/ $TiO_2$  (105,116). Neste caso a eliminação do agente antibacteriano aumentou com o aumento da dosagem do catalisador de 0.1 g/L para 0,2 g/L, no entanto, um aumento para 0,4 g/L não levou a um aumento na eficácia (105,116). Por outro lado, a eficácia dos fotocatalisadores está relacionada com a estabilidade destes materiais, em adição, este parâmetro é importante na determinação dos custos económicos. Foi estudada a estabilidade de  $CdS/Fe_3O_4/g-C_3N_4$  durante a degradação fotocatalítica do antibiótico tetraciclina, onde o catalisador se manteve estável durante 5 ciclos (105,117).

A técnica de oxidação eletroquímica é outro método que pode ser utilizado para a degradação de antibióticos, consiste na oxidação e transformação de substâncias orgânicas em material não-tóxico, por ação de uma corrente elétrica (105). Esta tecnologia pode ser subdividida em oxidação direta e indireta, geralmente estas ocorrem simultaneamente. No processo de oxidação direta, os contaminantes orgânicos que se encontram na água reagem diretamente com o ânodo e perdem eletrões para formar pequenos compostos moleculares. No processo de oxidação indireta, os aniões presentes na água reagem com o ânodo e produzem compostos intermediários, como o radical hidroxilo, com capacidade de oxidar e degradar compostos orgânicos. Esta técnica está relacionada com eletrólitos, onde eletrólitos diferentes levam a compostos oxidativos diferentes o que, conseqüentemente, leva a eficácias de degradação diferentes (105).

A oxidação eletroquímica depende do material do eléctrodo, da densidade da corrente e do valor de pH. O ânodo utilizado inicialmente é um eléctrodo metálico que consiste num eléctrodo desprotegido, sem película de óxido (105). Este tipo de ânodos são altamente condutivos, porém são propensos à dissolução durante o processo de eletrólise o que,

subsequentemente, leva à perda do ânodo e à contaminação da solução com novas impurezas. Deste modo, têm sido estudados diversos materiais para o uso de ânodos, como carbono vítreo, diamante-condutor, grafite, platina,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{b-PbO}_2$ ,  $\text{IrO}_2/\text{Ti}$ ,  $\text{Ti/TiO}_2$  - $\text{RuO}_2$  - $\text{IrO}_2$ , entre outros (105). No que diz respeito à densidade da corrente, esta afeta a força motriz da reação de oxidação eletroquímica e, conseqüentemente, afeta a eficácia da reação. Na utilização de  $\text{Ti/PbO}_2$  como ânodo para a oxidação de clorotetraciclina foi reportado que a degradação do antibiótico seguia uma pseudocinética de primeira ordem e que a constante da taxa de reação aumenta com o aumento da densidade de corrente aplicada devido à maior taxa de rendimento dos radicais hidroxilo (105,118). No estudo da degradação de sulfacloropiridazina com ânodo de diamante e com boro foi verificado que o tempo necessário para a degradação completa deste fármaco diminui com o aumento da densidade da corrente, para além disso, a taxa de mineralização foi de 76%, 84%, 89%, 93% e 95% quando a densidade da corrente foi de 100, 200, 300, 350 e 400 mA, respetivamente (105,119).

O valor de pH da solução influencia o desempenho da oxidação, como exemplo foi reportado que a taxa de eficácia da degradação do antibiótico trimetoprim diminui a um valor de pH de 3,0 devido à presença de  $\text{HSO}_4$  que capta os radicais hidroxilo, e o mesmo se observa a um pH de 4,5 onde a taxa de degradação diminui devido à precipitação de ferro (105,120).

O uso de radiação ionizante é uma técnica recente para a degradação de contaminantes orgânicos, por via direta ou indireta (105). No processo radiolítico da água, são formadas diversas espécies ativas como radicais hidroxilo que, como visto anteriormente, conseguem oxidar poluentes orgânicos e eletrões solvatados ( $e_{aq}^-$ ) que têm a capacidade de reduzir contaminantes orgânicos (105).

A degradação de substâncias orgânicas por radiação ionizante depende de vários fatores, como a concentração inicial do contaminante, a dose absorvida, a matéria orgânica e aniões inorgânicos, o pH inicial e a matriz da água (101,105,121). A concentração inicial dos antibióticos afeta o número de colisões eficazes entre o fármaco e os radicais (101). Por exemplo foi reportada a eliminação de 100% de sulfadiazina com uma concentração inicial entre 25-40 mg/L, no entanto, na presença de uma concentração inicial de 50 mg/L foi observada uma eliminação de 92% do antibiótico (101,121).

A dose absorvida afeta a taxa de degradação dos antibióticos, de modo geral a degradação aumenta com o aumento da dose absorvida, enquanto o rendimento radiolítico diminui com o aumento da concentração de um dado contaminante (101,105). A investigação da degradação da sulfadiazina dissolvida em água destilada evidenciou que a degradação e mineralização do antibiótico aumenta com o aumento da dose absorvida e segue um pseudomodelo cinético de primeira ordem (101,121).

As águas residuais são um ambiente com matrizes complexas que geralmente incluem aniões, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  e compostos orgânicos como o ácido húmico, glucose e peptona, estes compostos conseguem interferir com a degradação radiolítica dos antibióticos através da reação com os radicais (101,105). O anião  $\text{CO}_3^{2-}$  pode reagir com  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{H}\bullet$  enquanto  $\text{HCO}_3^-$  consegue reagir com  $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{H}$  e  $e_{aq}^-$  sequestrando-os e, conseqüentemente leva a uma diminuição dos radicais hidroxilo e reduz a probabilidade

destes radicais reagirem com os antibióticos. Foi observado que a degradação de norfloxacina diminuiu de 89,1% para 61,8% e 56,9% após a adição de 31 e 40 mmol/L de  $\text{CO}_3^{2-}$ , respetivamente. Adicionalmente, com a adição de 80 e 100 mmol/L de  $\text{HCO}_3^-$  também se observou uma diminuição da degradação do antibiótico de 89,1% para 78,7%, respetivamente (101). Por um lado, os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) conseguem reagir com  $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{H}$  e  $e_{\text{aq}}^-$ , onde o nitrito reage com estes compostos diminuindo a sua concentração, enquanto o nitrato pode facilmente reagir com iões hidrogénio e gerar  $\text{HNO}_3$  que diminui a concentração de  $\bullet\text{OH}$  e  $\bullet\text{H}$  (101). Deste modo, a presença de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  diminui a frequência de colisões entre  $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{H}$  e  $e_{\text{aq}}^-$  com as moléculas de antibiótico e, conseqüentemente, reduz a degradação radiolítica destes fármacos. Foi reportado que a percentagem de remoção de sulfametoxazol sujeito a 100 Gy de radiação, diminuiu de 56,89% para 44,84 e 34,83% na presença de nitrito e nitrato, respetivamente (101,122). Também se verificou uma redução na eficácia da degradação de antibióticos como amoxicilina, cefradina, ciprofloxacina, ofloxacina e sulfametoxazol (105,123,124).

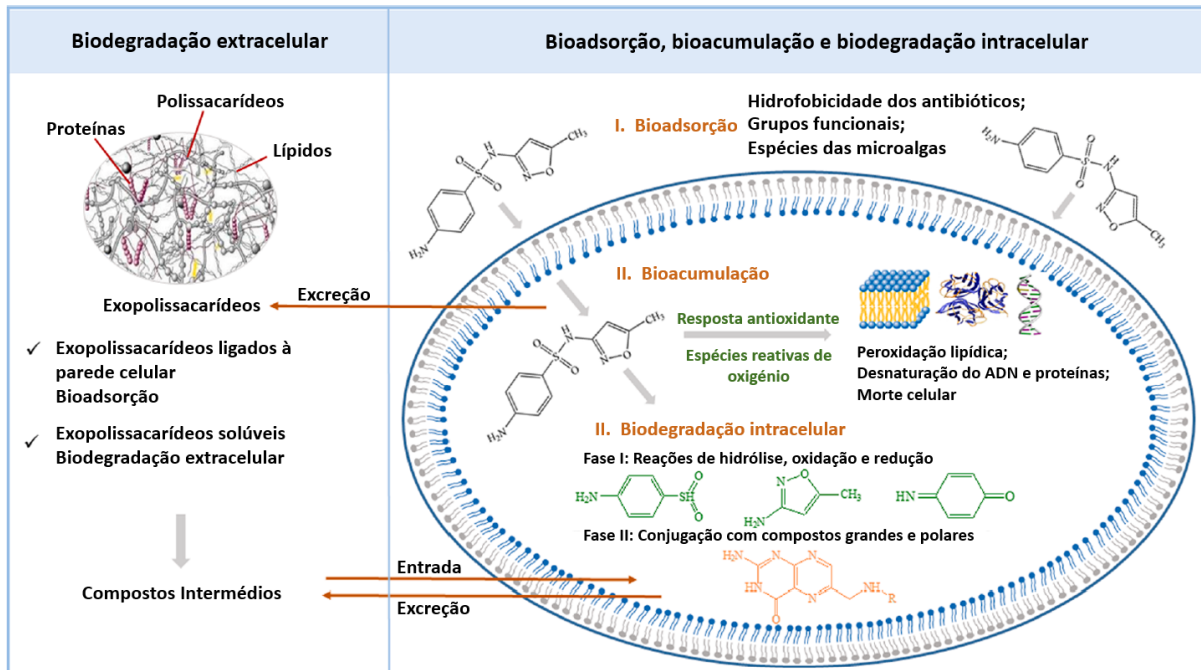
Relativamente aos compostos orgânicos, a presença destes pode interferir com a degradação dos antibióticos, visto que, podem interagir com os radicais hidroxilo e limitar a interação destes com os fármacos (101). Foi estudada a degradação do antibiótico ciprofloxacina após a adição de vários compostos, sendo um destes o ácido húmico, tendo sido reportado que 0,5 mol/L de ácido húmico diminuiu a eficácia de degradação do antibiótico de 99,6% para 47,2% na presença de irradiação de 1000 Gy (101,125). A presença de álcool isopropílico, metanol, tert-butanol e tiourea também pode diminuir a eficácia da degradação, dado que, estes compostos são fortes sequestradores de radicais hidroxilo o que leva ao consumo destes radicais antes de conseguirem reagir com os antibióticos. Por exemplo, foi observado que o álcool isopropílico e tert-butanol diminuíram a eficiência da eliminação de sulfametoxazol de 98,3% para 27,5 e 76,5%, respetivamente (101,122). Por outro lado, o valor de pH da solução influencia a taxa de degradação dos antibióticos por parte da radiação ionizante, dado que, o pH afeta a composição em radicais na solução. Em condições ácidas a concentração em iões hidrogénio é superior à concentração de iões hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), que conseguem combinar com  $e_{\text{aq}}^-$  e inibir a reação desta molécula com  $\bullet\text{OH}$  e, conseqüentemente existe maior quantidade de radicais hidroxilo disponíveis para reagir com as moléculas dos antibacterianos. Por outro lado, em condições alcalinas, a concentração em  $\text{OH}^-$  é superior à concentração em  $\text{H}^+$ . Estes iões hidrogénio podem reagir com  $\bullet\text{OH}$  e dar origem a  $\text{O}^-$ , com baixa atividade oxidativa e  $\text{H}_2\text{O}$  reduzindo deste modo a concentração em radicais hidroxilo e diminuindo a eficiência da degradação (101,105). A determinação da eficácia da degradação por radiação gamma da cefalosporina C evidenciou uma maior remoção do antibiótico numa solução com um valor de pH de 3,5 comparativamente com soluções com valores de pH de 6,6 e 9,2 (126).

No caso dos antibióticos com carácter de zwitterião o valor pH pode influenciar a distribuição das suas formas iónicas e moleculares, e a carga superficial e, deste modo, pode gerar forças de atração ou repulsão entre as diferentes formas do antibiótico e afetar a eficiência da degradação (105). Relativamente ao sulfametoxazol, este tem valores de pKa de 1,5 e 5,7 e quando o pH é superior ao pKa 5,7 o antibiótico está na sua forma negativa que produz forças de repulsão e, conseqüentemente diminuiu a taxa de reação (105,124).

Os tratamentos por processos de oxidação avançados têm imensas vantagens, como o elevado potencial oxidativo dos radicais hidroxilo que leva a reações não seletivas, o que permite reduzir o tempo de retenção necessário para a eliminação dos contaminantes; a montagem de plantas de POA não exige muito espaço o que permite instalar uma estação de tratamento de águas de pequena escala e estes processos transformam os antibióticos e outros compostos orgânicos em moléculas inorgânicas que são facilmente eliminadas com a vantagem de não existir a produção de lamas, visto que as POAs reagem diretamente com os poluentes dando origem a produtos não tóxicos (127).

#### 4.1.3 Tratamento com Microalgas

As tecnologias baseadas em microalgas têm ganhado popularidade como um método eficaz para o tratamento de efluentes industriais e municipais, devido às diversas vantagens que este sistema proporciona, como sendo ecológico, impulsionado por energia solar, capacidade de fixação de dióxido de carbono, introdução de nutrientes e também, a possibilidade de desenvolvimento de produtos derivados de algas (128,129). Estes tipos de tecnologias têm demonstrado boa eficácia na eliminação de produtos farmacêuticos, como o reportado para uma lagoa de algas cultivada com *Coelastrum* spp. onde se observou a eliminação de 33 antibióticos presentes em águas residuais municipais, com taxas de eliminação médias de antibióticos 5-50% superiores aos tratamentos convencionais de lamas ativadas durante um período de 6 meses (128,130). Os mecanismos de eliminação dos antibióticos por parte das microalgas incluem bioacumulação, bioadsorção e biodegradação e encontram-se ilustrados na **Figura 4.2**. Adicionalmente, certos antibióticos podem ser posteriormente eliminados através da fotodegradação e volatilização na presença de microalgas ou num sistema de tratamento por microalgas, no entanto, estes processos ocorrem sob condições restritas pouco comuns e são geralmente considerados pouco significativos (129,131). O processo de eliminação pode ser diferenciado em três fases: i) uma rápida adsorção passiva mediante interações físico-químicas entre a superfície celular e os poluentes; ii) uma lenta transferência de moléculas através da membrana celulares e; iii) ocorre a bioacumulação ou biodegradação, ou ambos, no interior da célula (129).



**Figura 4.2** – Mecanismos de eliminação dos antibióticos por microalgas, como bioadsorção, bioacumulação e biodegradação (Adaptado de (129)).

Deste modo, a bioadsorção é um processo extracelular que ocorre quando os antibióticos são absorvidos pela parede celular das microalgas ou por substâncias orgânicas como os exopolissacarídeos excretados pelas microalgas para o ambiente circundante (128,129). Estes compostos são caracterizados por uma combinação de polímeros de alto peso molecular abrangendo ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lípidos e substâncias húmicas que habitualmente visam proteger as células de um ambiente inóspito (129). Os exopolissacarídeos podem ser subdivididos em dois tipos, em exopolissacarídeos ligados que estão conectados às células das microalgas, e em exopolissacarídeos solúveis, que são excretados pelas microalgas e que se encontram em suspensão ou ligados de modo deficiente às células. A diversa composição destes compostos faz com que os exopolissacarídeos contribuam com múltiplos grupos funcionais, tais como o grupo amina, carboxilo, hidroxilo e regiões hidrofóbicas e, desta forma, providenciam sítios de ligação para a adsorção de compostos orgânicos e inorgânicos (129). A bioadsorção baseada em microalgas depende da estrutura do antibiótico alvo, como a hidrofobicidade e os grupos funcionais disponíveis, da espécie de microalga e das condições ambientais. Os antibióticos com logaritmo de coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) elevado ( $>5$ ) e pesos moleculares mais elevados são mais facilmente adsorvidos comparativamente a fármacos com baixos valores de  $\log K_{ow}$  ( $<2,5$ ), deste modo, os compostos lipofílicos apresentam uma elevada afinidade de adsorção às microalgas devido às interações electrostáticas enquanto os compostos hidrofílicos têm uma baixa adsorção (128,129). A capacidade de adsorção é também dependente da espécie de microalga, nomeadamente foi observado que a capacidade de adsorção do antibiótico tetraciclina por parte das microalgas *Scenedesmus quadricauda* e *Tetraselmis suecica* foram de 295,34 e 56,25 mg/g, respetivamente (129,132). Estes resultados indicam que as capacidades de bioadsorção das microalgas são altamente específicas às suas propriedades

químicas e físicas, tal como as características químicas superficiais e a área de superfície (129). Em adição, as paredes celulares e os exopolissacarídeos são predominantemente carregados negativamente, dado que, os grupos funcionais presentes incluem os grupos carboxilo e hidroxilo. Deste forma, os antibióticos com carga positiva podem ser adsorvidos eficazmente por interações eletrostáticas (129).

A adsorção pelas microalgas pode ser melhorada através da otimização das variáveis que influenciam este processo, como a concentração inicial de antibiótico, a dosagem do biossorvente, valor de pH, temperatura, tempo de contacto e os estimulantes de excreção de exopolissacarídeos. Como exemplo, foi reportado que a eficácia de eliminação de metronidazol por *Chlorella vulgaris* diminuía com o aumento da concentração inicial do antibiótico (129,133). Foi ainda descrito que a adsorção da tetraciclina por parte da microalga *Scenedesmus quadricauda* sofreu um grande aumento durante um período de 60 minutos, enquanto a adsorção por parte da microalga *Tetraselmis suecica* foi independente do tempo de contacto (129,132). Por um lado, este processo é dependente do valor de pH, onde este parâmetro influencia a ionização ou dissociação dos antibióticos no meio aquoso e, também, a carga de superfície dos adsorventes. Por outro lado, a adsorção é um processo termodinâmico onde as alterações de temperatura influenciam a taxa de adsorção dos antibióticos na superfície celular das microalgas. Em adição, a composição e quantidade dos exopolissacarídeos também afeta a adsorção destes medicamento, onde uma elevada proporção de proteínas/polissacarídeos resulta numa hidrofobicidade mais forte e mais locais de adsorção (129).

A bioadsorção é considerada um dos mecanismos principais para a eliminação de fármacos, no entanto, em certos estudos foi observado que este processo não é o primário, mas atua como uma primeira etapa para mecanismos posteriores como bioacumulação e biodegradação (128,129,134).

A bioacumulação é um processo metabolicamente ativo que integra a absorção de antibióticos por células das microalgas, onde estes fármacos se ligam a proteínas intracelulares ou outros compostos. A bioadsorção é considerada um precursor da bioacumulação, mas nem todos os poluentes adsorvidos à superfície das microalgas podem entrar nas células e acumular-se no seu interior. Deste modo, os antibióticos podem ser transportados através da membrana celular para dentro das células por três vias: i) difusão passiva; ii) difusão facilitada e iii) transporte ativo. Na primeira via não é despendida energia, visto que, os fármacos antibacterianos são difundidos através da membrana plasmática de uma região com elevada concentração destes fármacos para uma região com baixa concentração, nomeadamente os antibióticos com baixo peso molecular e que sejam apolares e lipossolúveis conseguem atravessar a membrana celular por difusão passiva devido à sua hidrofobicidade (128,129). Em adição, a exposição a antibióticos ou outros fatores de stresse podem induzir alterações na permeabilidade da membrana celular e levar à difusão passiva, que ocorre devido a fenómenos de despolarização ou hiperpolarização (129,131). A interferência com a integridade da membrana celular também pode favorecer a difusão passiva dos antibióticos, este fenómeno foi observado quando se adicionou cloreto de sódio 1% (p/v) o que provocou um aumento significativo na bioacumulação de levofloxacina por *C.*

*vulgaris* de 101 µg/g comparativamente a 34 µg/g onde não se adicionou cloreto de sódio (129,135).

A difusão facilitada refere-se ao transporte de antibióticos através da membrana plasmática por meio de proteínas transportadoras, enquanto a terceira via consiste no transporte ativo recorrendo a energia para o transporte desta classe terapêutica contra o gradiente de concentração (135).

A acumulação de certos antibióticos nas células das microalgas pode induzir a produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS), como radicais superóxido, radicais hidroxilo e radicais alcóxido e formas não radicais como peróxido de hidrogénio e oxigénio singlete ( $^1O_2$ ). Os ROS são importantes para regular o crescimento, a diferenciação e a proliferação dos microrganismos. Geralmente, estas espécies encontram-se num nível basal no interior das células, sendo responsáveis por auxiliar na proliferação e metabolismo celular, mas também na transdução de sinais. A exposição aos antibióticos leva a um aumento no nível de espécies reativas de oxigénio no interior das microalgas, o que induz a desnaturação de DNA e proteínas e, conseqüentemente, leva a danos celulares, mutagénese e até mesmo morte celular. No entanto, as células poderão diminuir os níveis de antibióticos no seu interior através de transportadores, deste modo, a bioacumulação funciona como um precursor da biodegradação (128,129). Foi observada a acumulação de sulfametazina na microalga *C. pyrenoidosa* com posterior biodegradação (128,136). Adicionalmente, estes fármacos acumulados podem ser transferidos e ampliados através da cadeia alimentar, proporcionando riscos para a saúde humana e induzindo o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos (128,129).

A biodegradação é um processo complexo que envolve a degradação de compostos orgânicos, através da biotransformação que leva à formação de metabolitos intermediários, ou através da mineralização completa em dióxido de carbono e água por culturas microbianas. O mecanismo da degradação pode ser dividido em duas categorias: i) degradação metabólica, onde o antibiótico é a única fonte de carbono ou aceitador/dador de eletrões para as microalgas; e ii) cometabolismo, onde substratos orgânicos adicionais são utilizados para sustentar a produção de biomassa e atuam como dadores de eletrões para o substrato sem crescimento. A biodegradação de antibióticos mediada por microalgas inclui a degradação intracelular e extracelular, ou a combinação de ambos, onde a degradação inicial ocorre no meio extracelular e, posteriormente, ocorre a metabolização intracelular dos compostos resultantes. A degradação extracelular é dependente da excreção de exopolissacarídeos pelas microalgas, onde estes compostos atuam como um sistema digestivo externo e também, como emulsificantes e como tensoativos, para aumentar a biodisponibilidade dos antibióticos para subsequente bioacumulação pelas microalgas. Relativamente à degradação intracelular, esta é dependente da acumulação dos antibióticos no interior das células das microalgas (128,129).

A biodegradação de antibióticos mediada por microalgas pode ser descrita como um processo de catálise enzimática subdividido em duas fases, onde na primeira fase ocorre a adição de grupos funcionais e inclui reações de hidrólise, oxidação e redução, onde estas reações são catalisadas pelo citocromo P450 (CYP450), citocromo b5 e NADPH-CYP450

reduzase. Deste modo, durante esta primeira fase são observadas diversas reações enzimáticas como a metilação, desmetilação, carboxilação, descarboxilação, oxidação e a clivagem de anéis (129,137–141). Adicionalmente, os metabolitos resultantes desta fase têm um aumento na sua polaridade e hidrofiliçidade o que facilita a excreção de xenobióticos. Os processos da segunda fase consistem na conjugação dos fármacos ou dos metabolitos obtidos da primeira fase, com compostos polares, como açúcares e aminoácidos, com o objetivo de aumentar a solubilidade em água destes compostos (129). Foi descrito que a biodegradação de sulfametoxazol por *C. pyrenoidosa* passa por reações de fase 1 como oxidação e hidroxilação do grupo amina, seguida por reações de fase 2 como a formilação e conjugação (129,139).

Os tratamentos convencionais baseados em microalgas podem ser divididos em duas categorias: tanques abertos e fotobiorreatores fechados onde são aplicadas células suspensas ou imobilizadas. O uso de células suspensas é o sistema mais comumente utilizado para o crescimento de microalgas devido ao seu custo-benefício, sendo extensamente usados em tanques abertos e fotobiorreatores fechados para o tratamento de águas residuais. No caso de tanques abertos, mais concretamente os de taxa elevada utilizados em grande escala para o cultivo de microalgas devido ao seu baixo custo de construção, baixo gasto de energia e fácil escalonamento, adicionalmente, vários estudos demonstraram que estes sistemas são comparáveis a tratamentos convencionais de lamas ativadas (129,130,142). Foi reportada a eliminação eficaz da ciprofloxacina num tanque aberto, principalmente por bioadsorção e fotólise (143). No entanto, os sistemas abertos devido à mistura e oscilações insuficientes na cultura levam a restrições na produção de biomassa, na eliminação eficaz de nutrientes e introduzem micropoluentes nestes sistemas, por outro lado, os fotobiorreatores fechados comparativamente a tanques abertos têm diversas vantagens, dado que, os parâmetros de crescimento e condições do meio de cultura podem ser controlados, a contaminação e evaporação podem ser prevenidos e é mais eficaz o tratamento das águas residuais e a produção de compostos biológicos, como lípidos e biomassa (129).

Os tratamentos à base de microalgas podem ser associados a outros tipos de tratamentos, como ao tratamento convencional de lamas ativadas que é economicamente favorável para o tratamento de águas residuais devido a necessidades baixas de energia, bom custo benefício e o potencial de recuperar recursos. Adicionalmente, estes tratamentos também podem ser aplicados em conjunto com processos de oxidação avançados, como a reação de Fenton e ozonização. O contributo da radiação UV e microalgas para a eliminação dos antibióticos amoxicilina e cefradina num sistema híbrido de radiação UV e microalgas foi significativo tendo as algas desempenhado o papel principal no tratamento, mais especificamente, a espécie *S. obliquus* em combinação com a irradiação por UV a 365 nm permitiu a uma eficácia de eliminação de 99,84% dos antibióticos num intervalo de 24 h (129,144).

## 5. Boas Práticas de utilização de antibióticos

O termo Administração de antimicrobianos (do inglês *Antimicrobial Stewardship* (AS)) engloba programas e intervenções que visam otimizar o uso de antimicrobianos, onde estão incluídos os antibióticos. Este conceito relativamente recente pode ser definido como “a seleção, a posologia e duração da terapêutica ideal que determina a melhor resposta clínica no tratamento ou prevenção da infecção, com um mínimo de toxicidade para o doente e um impacto mínimo no desenvolvimento de resistências”. Os três objetivos de AS são: i) seleção do tratamento antimicrobiano mais adequado e, também, o regime posológico e duração da terapêutica adequados para cada doente; ii) prevenir o uso excessivo (abusivo), a utilização inadequada; iii) minimizar o desenvolvimento das resistências (145,146).

Neste âmbito, podem ser implementadas estratégias, quer por diversas organizações governamentais ou associações quer individualmente pelos profissionais de saúde, como médicos, enfermeiros, farmacêuticos e veterinários. Apesar da origem deste conceito ter surgido dentro do sistema de saúde no contexto do ser humano, é importante a sua aplicação em contextos mais abrangentes, como a saúde animal (145).

Deste modo, neste capítulo são abordadas diversas ações que podem ser realizadas por médicos, farmacêuticos, veterinários e pela comunidade para o uso racional dos antibióticos e, conseqüentemente, evitar o desenvolvimento de resistência e estes fármacos.

### 5.1 Médicos/Prescritores

A implementação de programas de AS pode auxiliar os médicos na obtenção de melhores resultados clínicos e na minimização das consequências devido à prescrição excessiva de antibióticos. Relativamente ao meio hospitalar, estes programas aumentam a taxa de cura das infeções, mas também diminuem os efeitos adversos, a redução das infeções por *C. difficile*, as falhas no tratamento, os custos e duração do internamento e a resistência aos antibióticos (147).

Um dos aspetos a ter em conta após a aplicação do tratamento empírico com antibióticos de largo espetro é a técnica de “desescalada”, onde é feita a transição do tratamento inicial para um tratamento mais direcionado. Isto deve ser realizado 48-72 horas após a implementação da terapêutica inicial e após obtenção dos resultados microbiológicos e outras análises pertinentes para o diagnóstico, como a identificação do microrganismo isolado e a sua suscetibilidade (148).

A duração do tratamento também pode ser reduzida em diversas situações como, por exemplo, na profilaxia perioperatória. O uso de biomarcadores como procalcitonina é benéfico para o controlo da duração da terapêutica em casos onde existe incerteza na decisão clínica. Desta forma, a redução nos dias da terapêutica antibacteriana leva a vantagens como a redução nos custos, diminuição da pressão seletiva e da emergência de resistências. Outro aspecto relevante é que a terapêutica com antibióticos por si só não é capaz de prevenir

infecções no local cirúrgico, deste modo, é importante implementar outras estratégias como a eficaz esterilização de instrumentos, um manuseamento apropriado de feridas cirúrgicas e práticas de controlo da infeção (148,149).

O ajuste adequado da posologia é também um fator importante para se obter uma terapêutica antibacteriana eficaz e segura. Este ajuste deve ser realizado tendo em consideração as características de cada indivíduo, medicação concomitante, natureza e a severidade da doença, microrganismo infeccioso, e as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do antibiótico prescrito. Por outro lado, a via de administração do antibiótico deve ser alterada da via parentérica para a via oral quando as condições do doente o permitem e quando a biodisponibilidade é assegurada, o que tem impacto na redução do tempo de internamento e nos custos do tratamento (148,150,151).

Os responsáveis pela prescrição devem manter-se atualizados sobre as orientações aplicáveis para a prescrição de antibióticos, e a prescrição de um agente antibacteriano tem que ter em atenção e estar de acordo com as orientações relevantes, na dose e via de administração adequadas e pelo período mais curto em que seja eficaz. Os prescritores devem igualmente evitar ao máximo a prescrição destes fármacos no tratamento de infeções virais ou infeções bacterianas autolimitadas e também é necessário que tenham em consideração o adiamento da prescrição de antibióticos em circunstâncias específicas e consoante as orientações, como no caso da otite média aguda e rinosinusite aguda que são condições autolimitadas e demonstram resolução espontânea sem que seja necessário o uso de antibióticos (150,152,153).

No momento da prescrição é necessário considerar os fatores inerentes a cada doente, como a idade, comorbilidades, medicação concomitante, a função renal e hepática, possíveis alergias, gravidez, amamentação e fatores de risco para a resistência aos antibióticos (150).

Os médicos devem implementar estratégias de comunicação para educar os doentes sobre as situações onde os antibióticos devem ou não ser utilizados como, por exemplo, no caso de infeções virais onde os antibióticos não fornecem nenhum benefício e podem levar a efeitos adversos. Estas explicações devem ser combinadas com recomendações para a gestão dos sintomas e a recomendação quando e como os doentes devem procurar aconselhamento médico (17,154).

## 5.2 Farmacêuticos

Os farmacêuticos têm um papel importante nos programas de AS, visto que, podem intervir quer ao nível do internamento, ambulatório e nos cuidados continuados. Dentro destes programas, os farmacêuticos podem desenvolver e gerir as orientações (*guidelines*) do uso de antibióticos, reavaliar a terapêutica antibacteriana de doentes selecionados de modo a otimizá-la, fornecer informações aos restantes profissionais de saúde sobre o uso racional dos antibióticos, e podem ainda supervisionar os resultados após o uso destes fármacos (155).

No contexto hospitalar, o farmacêutico deve integrar a equipa de gestão de antimicrobianos onde pode exercer funções que incluem a avaliação da conformidade da

prescrição com as *guidelines*, aconselhamento sobre a utilização de antibióticos de uso restrito, a revisão da duração do tratamento com antibióticos e disponibilização de informações sobre a dosagem, preparação e a administração desta classe terapêutica (150).

Os farmacêuticos podem contribuir para a prevenção de infecções tomando medidas para evitar e reduzir a transmissão de infecções entre os doentes, profissionais de saúde e outras pessoas envolvidas no sistema de saúde. Adicionalmente, o farmacêutico pode realizar a promoção da vacinação que diminui o uso de antibióticos diretamente e indiretamente (155).

Para os utentes, os farmacêuticos são os profissionais de saúde de maior proximidade e daí resulta a sua importância para a prestação de informações relativas aos antibióticos. Deste modo, estes profissionais devem dispensar agentes antibacterianos unicamente com receita, salvo exceções regulamentares que permitam o oposto, informar os utentes sobre a eliminação adequada dos antibióticos remanescentes, garantir que o doente compreende a dosagem e a duração do tratamento e o procedimento na tomada do medicamento para melhorar a adesão ao tratamento e informar os doentes sobre os possíveis efeitos adversos provocados por estes fármacos (150,156).

É crucial que o farmacêutico participe em campanhas de saúde pública locais, regionais ou nacionais para a promoção do uso racional de antibióticos, na promoção de medidas de prevenção de infecções e na educação sobre os perigos do desenvolvimento de resistência aos antibióticos (150,155).

### **5.3 Comunidade em geral**

A comunidade em geral pode contribuir consideravelmente na prevenção da resistência aos antibióticos através de diversas ações, nomeadamente, na prevenção de infecções e no uso prudente de antibióticos.

Deste modo, o público deve seguir diversas normas de higiene pessoal, como a lavagem das mãos para evitar a disseminação de infecções, cuidados na preparação de alimentos, e também realizar vacinação regular para prevenir infecções. É essencial que i) a toma de antibióticos seja feita apenas com a prescrição do médico, ii) que a duração da terapêutica seja estritamente cumprida apesar do alívio dos sintomas, iii) não guardar antibióticos que sobram de tratamentos anteriores para uso posterior, iv) não partilhar estes fármacos e não tomar antibacterianos para o tratamento de infecções virais como constipações ou gripe (157–159).

A OMS e o CDC apresentam informações e material didático sobre recomendações dirigidas ao público em geral sobre a resistência aos antibióticos, a importância da vacinação e os cuidados a ter em viagens para países estrangeiros que são muito úteis em ações de educação para a saúde (158,160).

#### **5.4 Veterinários e Produtores Pecuários**

Os veterinários têm como responsabilidade promover a saúde pública, saúde animal e o bem-estar animal, designadamente, a identificação, prevenção e o tratamento de doenças dos animais. Estes profissionais devem incentivar medidas de higiene, procedimentos de biossegurança, estratégias de vacinação e métodos seguros de criação de animais (161).

Relativamente ao uso de antibióticos, os veterinários só devem prescrever estes fármacos para animais que se encontram sob a sua supervisão. Deste modo, é da responsabilidade do veterinário realizar um exame clínico do animal e, posteriormente, prescrever ou administrar antibióticos só quando for necessário e evitar o uso de antibióticos clinicamente importantes. A escolha do agente antibacteriano deve ser realizada de acordo com os resultados laboratoriais, tendo em consideração as características farmacocinéticas e a distribuição tecidual para garantir que o agente terapêutico é eficaz no local da infeção e, com a posologia e via de administração adequadas (161,162).

É importante que os produtores pecuários garantam e reforcem a biossegurança das quintas e previnam as infeções através da melhoria do saneamento e bem-estar animal, que promovam e apliquem boas práticas durante todo o procedimento de produção e processamento de alimentos de origem animal, elaborarem um plano de saúde em colaboração com veterinários com medidas de prevenção de infeções, e sempre que apropriado procedam ao isolamento dos animais doentes de forma a evitar a disseminação de infeções, realizem a vacinação dos animais e quando possível utilizar estratégias alternativas aos antibióticos, que utilizem os agentes antibacterianos apenas sob a supervisão e indicação de um veterinário e, por fim, que evitem o uso de antibióticos como promotores de crescimento ou como prevenção de infeções em animais saudáveis (158,161,162).

## 6. Alternativas e ações complementares à utilização de antibióticos

### 6.1 Probióticos e Prebióticos

#### 6.1.1 Probióticos

Os agentes probióticos, de acordo com OMS e com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados no organismo em quantidades adequadas, podem levar a efeitos benéficos” (163). Os microrganismos mais frequentemente utilizados como probióticos são as bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* Nissler, *Propionibacterium*, *Bacillus* e a levedura do gênero *Saccharomyces*(164,165).

##### 6.1.1.1 Benefícios e Riscos para a Saúde

Os benefícios para a saúde pelos probióticos são diversos e geralmente envolve a restrição de doenças gastrointestinais, a diminuição de reações alérgicas, a proteção do sistema cardiovascular, aprimoramento da função imunológica intestinal, efeitos anti-tumorais, propriedades hipocolesterolêmicas e secreção de moléculas como antioxidantes e anti-inflamatórias, como os ácidos gordos de cadeia curta (nomeadamente o butirato), enzimas e péptidos (164,166).

Adicionalmente aos benefícios para a saúde, os probióticos podem contribuir na redução do risco de desenvolvimento de resistência aos antibióticos e melhorar a adesão à terapêutica. Por um lado, a administração concomitante de probióticos com antibióticos reduz a duração, incidência e severidade de diarreia associada à toma dos antibióticos, contribuindo para a adesão à terapêutica e, por outro lado, os probióticos podem contribuir para a redução do risco de doenças infecciosas em humanos e, deste modo, reduzir o uso de agentes antibacterianos (165,167,168). Foi reportado que os probióticos podem reduzir em 50 % as infeções causadas pela bactéria *C. difficile* em grupos de risco (169,170).

Foi também reportado que após a administração de um suplemento probiótico contendo as espécies *L. acidophilus* e *B. longum*, ocorreu um alívio dos efeitos secundários provocados pelos antibióticos e preveniu o desenvolvimento de resistências em crianças (165,171). Em recém-nascidos a administração do probiótico *Lactobacillus GG* na presença de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) contribuiu para a eliminação da bactéria no grupo de recém-nascidos que recebeu o tratamento com probióticos após 6 meses em comparação com o grupo que recebeu o tratamento padrão, mais especificamente, a eliminação bacteriana atingiu 95% e 52%, respetivamente (172,173). Foi também observado que a administração do probiótico *L. rhamnosus* HN001 diminuiu a colonização intestinal pela bactéria *S. aureus* em humanos (172,174). Por outro lado, os probióticos podem auxiliar os antibióticos através do controlo das propriedades de virulência das bactérias patogénicas com

impacto na melhoria da função de barreira intestinal. Por outro lado, estes compostos também atuam pela eliminação competitiva através da diminuição das agregações dos agentes patogênicos, adesão às células, antagonismo dos microrganismos patogênicos através da produção de ácidos orgânicos, estimulação da resposta imunitária e produção de compostos antimicrobianos como as bacteriocinas, o peróxido de hidrogênio, óxido nítrico que reduzem a população bacteriana e conduzem à perturbação das células em biofilme (168). Deste modo, os probióticos podem substituir parcialmente ou atuar como adjuvantes na terapêutica com antibióticos tornando-se excelentes auxiliares no tratamento de infecções multirresistentes. No entanto, é necessário ter em atenção a segurança do probiótico para que este não transporte genes de resistência aos antibióticos e, desta forma, não contribua para a disseminação da resistência a estes fármacos (168).

Embora os benefícios dos probióticos, também foram reportados efeitos adversos para a saúde do hospedeiro, como, por exemplo, acidose D-láctica, bacteriemia, confusão mental, estados imunocomprometidos, enfartamento e flatulência, reações alérgicas e transferência de ARG. Certas espécies de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* podem causar endocardite bacteriana e infecções da corrente sanguínea (164,166,175–177).

#### 6.1.1.2 Mecanismos de ação

Conforme mencionado acima o mecanismo de ação dos probióticos geralmente inclui a exclusão competitiva dos agentes patogênicos, secreção de substâncias antimicrobianas, aprimoramento da função da barreira epitelial e efeitos imunomoduladores.

O mecanismo de exclusão competitiva por parte dos probióticos consiste numa interação entre bactérias mediada pela competição pelos nutrientes disponíveis e pelos locais de ligação das bactérias. O modo como este mecanismo é realizado depende da espécie bacteriana, certas estirpes de probióticos conseguem inibir a colonização de bactéria patogênicas devido às suas propriedades adesivas específicas através da interação entre as proteínas de superfície e mucinas. As bactérias probióticas produzem moléculas de superfície adesivas como, por exemplo, enolases e piruvato desidrogenase, que aderem à matriz extracelular do hospedeiro (178,179). Estas moléculas auxiliam as bactérias comensais e probióticos na competição e na prevenção da ligação das bactérias patogênicas e no seu processo de colonização (179,180). Por exemplo, foi observado que o probiótico *Bifidobacterium* mediou as defesas do hospedeiro contra a septicemia estafilocócica (167,181). Os probióticos podem ainda expressar padrões moleculares associados a microrganismos ligados aos recetores de reconhecimento padrão transmembranares (PRRs) do hospedeiro, como recetores do tipo *Toll like Receptor* (TLR), que excluem os agentes patogênicos por competição. Em geral, os probióticos conseguem inibir a ligação das bactérias patogênicas através do efeito estérico nos recetores patogênicos nos enterócitos (179,180).

As bactérias probióticas são capazes de produzir uma variedade de substâncias com efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Estas substâncias incluem os ácidos orgânicos, nomeadamente, ácido láctico e ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. No caso

das bactérias do ácido láctico que produzem ácidos como o ácido láctico e o ácido acético que proporcionam um meio com pH ácido que inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas como a bactéria *Salmonella* (180,182). Estes ácidos orgânicos penetram a parede celular na forma não dissociada e, posteriormente, ocorre a sua dissociação no interior do citoplasma. Este fenómeno resulta num pH intracelular reduzido ou a acumulação intracelular da forma ionizada do ácido que, subseqüentemente, leva à morte da bactéria (165,180).

A barreira epitelial intestinal é fundamental para as funções fisiológicas normais, visto que, permite a passagem de nutrientes e eletrólitos do lúmen por vias intracelulares e paracelulares, mas também contribui para limitar o contacto com antigénios externos com o epitélio. Os agentes patogénicos entéricos conseguem quebrar a função de barreira por meio de ligação ou invasão das células epiteliais. Estes microrganismos também podem libertar toxinas que podem induzir uma resposta inflamatória e levar a alterações na permeabilidade da barreira intestinal (165,183). Os probióticos, em contrapartida, demonstraram a capacidade de controlar ou modular os efeitos citotóxicos induzidos por microrganismos patogénicos ao reforçarem a integridade da barreira intestinal (165,168,183). Os probióticos conseguem provocar este efeito por influência na expressão dos genes das proteínas da junção estreita entre as células epiteliais e, também, estimulam os péptidos antimicrobianos, a secreção da imunoglobulina A e aumentam a secreção de muco (165,184–186). O aumento da secreção do muco advém da sobre-expressão de mucinas que são compostos importantes da camada de muco epitelial. As mucinas formam uma barreira físico-química que protege as células epiteliais de danos enzimáticos, químicos e mecânicos causados por microrganismos patogénicos, adicionalmente, esta barreira limita a aderência microbiana e, subseqüente, invasão (165,180).

Um outro benefício das bactérias com valor probiótico é a sua capacidade de exercer um efeito imunomodulador no meio gastrointestinal e, também, conseguem alterar a resposta inflamatória do hospedeiro à infeção. Estas bactérias probióticas interagem com as células epiteliais e células dendríticas, com os monócitos e macrófagos e com linfócitos que são essenciais da imunidade inata e adaptativa (180). As células epiteliais intestinais e as células dendríticas têm a capacidade de reagir aos microrganismos intestinais através dos PRRs. Os PRRs mais conhecidos são os TLRs, que são proteínas transmembranares que se encontram na superfície celular ou na membrana das vesículas endocíticas (180,187). A sinalização mediada por TLRs regula a maturação das células dendríticas, estas células após a ativação pelas bactérias probióticas iniciam uma resposta apropriada, como, por exemplo, a diferenciação de células Th0 em células T reguladoras com um efeito inibitório nas respostas inflamatórias das células Th1, Th2 e Th17 (180,188,189). Adicionalmente, os probióticos conseguem regular a resposta imunitária da mucosa através da indução de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 e o fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e, simultaneamente, reduzem a expressão das citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e o interferão- $\gamma$  (180,189). Por outro lado, certos probióticos podem estimular a produção de imunoglobulina A secretória, este aumento protege o epitélio intestinal contra a colonização e invasão de agentes patogénicos, visto que, esta molécula se liga e neutraliza os antigénios bacterianos (165,180).

### 6.1.1.3 O risco de desenvolvimento de Resistências nos probióticos

O uso generalizado de antibióticos levou ao surgimento de resistência nos probióticos, o que pode conduzir a sérios problemas, uma vez que, os probióticos podem proporcionar a transferência de ARG a microrganismos patogênicos. Relativamente ao tipo de resistência, os probióticos podem apresentar os mesmos elementos de resistência que as bactérias patogênicas, podendo ser intrínseca ou adquirida (166).

A resistência intrínseca que é inerente à espécie bacteriana pode estar codificada no cromossoma e não ser transferível para outras bactérias. Este tipo de resistência pode ocorrer por duas vias diferentes: a bactéria probiótica pode não ter o alvo celular do antibiótico ou pode possuir bombas de efluxo que transportam o antibiótico para fora da célula. Este tipo de resistência pode ser benéfica quando os probióticos são necessários para restabelecer a microbiota intestinal durante ou após uma terapêutica com antibióticos. Por exemplo, a bactéria do gênero *Lactobacillus* apresenta resistência natural aos  $\beta$ -lactâmicos, bacitracina e vancomicina (166,190,191).

A resistência adquirida foi já reportada em probióticos como as bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*, onde os genes de resistência estavam presente em transposões ou nos plasmídeos conjugativos (166,192). Conforme já mencionado este tipo de resistência ocorre quando uma bactéria previamente sensível ao antibiótico desenvolve resistência, quer através de mutações no DNA ou por transferência horizontal de genes (166,193). A causa mais comum para a resistência adquirida nos probióticos é a pressão seletiva, devido à administração de um tipo de antibiótico a longo prazo ou repetida. No caso do probiótico *L. rhamnosus*, isolado do leite materno, foi identificada resistência a diversos antibióticos, como ampicilina, gentamicina e estreptomicina (194). Foi ainda reportado a transferência de genes de resistência à vancomicina localizados num plasmídeo da bactéria probiótica *Lactobacillus* para a bactéria *E. faecalis* em ratinhos, evidenciando o risco da disseminação de genes de resistência pelos probióticos (195).

Deste modo, a existência de estirpes de probióticos com resistências a antibióticos salienta o cuidado necessário na seleção das estirpes de probióticos disponíveis para o consumo do público em geral (166).

### 6.1.2 Prebióticos

O conceito de prebióticos foi introduzido pela primeira vez em 1995 pelos investigadores Glenn Gibson e Marcel Roberfroid (196). Conforme a definição mais recente (197), os probióticos são compostos não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente a atividade e/ou o crescimento de uma, ou mais espécies bacterianas presentes no trato gastrointestinal. Desta forma, os prebióticos são componentes resistentes às enzimas digestivas do TGI, mas são degradados pela microbiota intestinal. A inulina, frutose, glucose, lactulose e xilo-oligossacarídeos são exemplos de fontes de prebióticos, que são posteriormente são degradados em derivados como ácidos gordos de

cadeia curta (acetato, butirato e propionato), que exercem efeito anti-inflamatório (198). O reduzido tamanho destes ácidos e a sua capacidade em se difundir para a corrente sanguínea indica que podem ser utilizados no tratamento de distúrbios do TGI (45,165,172,199).

Os prebióticos estimulam o crescimento de grupos específicos da microbiota e os seus derivados reforçam a função de barreira da mucosa intestinal por mecanismos como, o estímulo da produção de muco, fornecimento de energia aos enterócitos, modulação da microbiota intestinal e metabolitos benéficos, redução do risco de encefalopatia e atividade antimicrobiana. Estes compostos também apresentam um mecanismo protetor indireto contra infeções patogénicas, através de mecanismos como a diminuição do valor de pH no meio intestinal e aperfeiçoamento da função das células epiteliais pela promoção do crescimento de microrganismos benéficos no intestino (165,199).

Estes componentes apresentam efeitos secundários mínimos, contudo, a administração de prebióticos pode causar flatulência, cólicas abdominais e alterações na consistência das fezes (172,198). Devido ao seu perfil de segurança, os prebióticos aparentam ser seguros para qualquer perfil de doente capaz de consumir alimentos por via entérica e como não são absorvidos sistematicamente, não existe uma dose definida por peso corporal ou idade. Desta forma, a dose diária pode ser reduzida ou o consumo destes compostos pode ser suspenso se os efeitos secundários interferirem com a vida diária do indivíduo (172).

No entanto, a dificuldade na realização de ensaios clínicos randomizados devido a diversos fatores que necessitam de controlo como, o tipo de dieta, o conteúdo em fibra e o volume de consumo, leva a uma diminuição da investigação sobre o uso de prebióticos para a manipulação da microbiota e do resistoma (199).

## **6.2 Bacteriocinas**

As bacteriocinas são pequenos péptidos antimicrobianos sintetizados por diversas bactérias, que permitem a autopreservação e conferem uma vantagem competitiva contra outras bactérias (200). Estas substâncias são produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém, a maioria das bacteriocinas são produzidas por bactérias Gram-positivas e apresentam uma grande diversidade relativamente às características bioquímicas, estrutura, espetro de atividade, peso molecular, mecanismos de ação e recetores das células alvo. (200–203)

A classificação das bacteriocinas ao longo do tempo foi dificultada pela variedade na estrutura e atividade destes compostos, no entanto, a primeira distinção entre bacteriocinas pode ser realizada pelo tipo de bactéria produtora, como bactérias Gram-positivas ou bactérias Gram-negativas (203).

As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas podem ser subdivididas em classe I, classe II, classe III e classe IV (203). A classe I, também denominada por lantibióticos, é constituída por bacteriocinas pequenas (<5 kDa) modificadas pós-transcricionalmente (200,203). Uma característica comum a esta classe é a presença de aminoácidos fora do comum, como lantionina e 3-metillantionina que formam várias estruturas em anel que proporciona a estabilidade estrutural, ao calor, ao pH e à proteólise. Este grupo é

habitualmente associado à inibição de bactérias Gram-positivas e de agentes patogénicos de origem alimentar (203). Adicionalmente, os lantibióticos podem ser divididos em duas subclasses, na subclasse Ia onde estão incluídos os péptidos mais longos com carga positiva, como epidermina, galidermina e nisina; na subclasse Ib é onde se incluem os péptidos com carga negativa e com uma estrutura globular e inflexível, como a lacticina 481 e a salivaricina (203).

Na classe II, também denominados por não-lantibióticos, não se encontram aminoácidos fora do comum na sua estrutura e as alterações pós-transcricionais estão limitadas à formação de pontes dissulfeto em certas bacteriocinas (pediocina PA-1 e pediocina Ach) (203). Nesta classe os péptidos continuam a apresentar um peso molecular baixo (<10 kDa) e a serem estáveis ao calor. Este grupo pode ser subdividido em quatro subclasses, na subclasse IIa os péptidos apresentam uma estrutura linear com uma ponte dissulfeto e atividade contra a bactéria *Listeria monocytogenes*, como por exemplo a leucocina A, acidocina A e pediocina PA-1; na subclasse IIb as bacteriocinas são constituídas por dois péptidos ( $\alpha/\beta$ ) necessários para a atividade antibacteriana, nesta classe está incluída a lactococina G, lactococina Q e plantaricina NC8; as bacteriocinas da subclasse IIc apresentam uma sequência peptídica sinalizadora que inclui um ou dois resíduos de cisteína na sua estrutura, os cistibióticos e os tiolibióticos, respetivamente, neste grupo podem ser encontradas as bacteriocinas como a lactococina A, divergicina A e acidocina B; por fim, a subclasse II d é constituída pelas bacteriocinas da classe II que não podem ser incluídas nas outras subclasses (200,203).

Relativamente à classe III, as bacteriocinas apresentam um maior peso molecular (>30 kDa) comparativamente às outras classes, com características termolábeis, líticas ou não líticas, neste grupo estão incluídos os péptidos zoocina A, lisotafina, helveticina J e helveticina V (200,203). Por fim, na classe IV estão incluídas as bacteriocinas que contêm lípidos e carboidratos na sua estrutura, o que torna estas moléculas sensíveis a certas enzimas como enzimas lipolíticas e glicolíticas (200,203).

### 6.2.1 Mecanismos de ação

As bacteriocinas, geralmente, são ativas contra as espécies relacionadas filogeneticamente à bactéria que produz a bacteriocinas em questão, o que confere um espectro de ação mais estreito, ou estes péptidos também podem ser ativos contra bactérias pertencentes ao mesmo género, proporcionando um espectro de ação mais alargado. Deste modo, as bacteriocinas podem inibir o crescimento de organismos patogénicos visando proteger a célula produtora destes péptidos através de diversos mecanismos de ação (200,202).

O mecanismo de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas está geralmente associado à disrupção da integridade da membrana plasmática e posterior morte celular (203). Este mecanismo pode ocorrer por várias vias, podendo ser realizado através da interação direta com o componente lípido II da membrana plasmática da bactéria, ou através da interação com o sistema manose-fosfotransferase ou sem o envolvimento de algum recetor específico. A atividade antibacteriana dos lantibióticos resulta da formação de poros

nas membranas plasmáticas bacterianas, no caso da nisina o efeito antibacteriano resulta da formação de poros onde é utilizado o lípido II como molécula âncora e, conseqüentemente, ocorre um aumento na permeabilidade da membrana da célula alvo e a sua morte. As bacteriocinas pertencentes à classe II têm como alvo o recetor manose-fosfotransferase, que consiste num sistema de transporte utilizado para acoplar a importação e fosforilação de açúcares. Neste sistema encontra-se a enzima EII composta por três proteínas, a proteína AB, C e D que funcionam como alvos para as bacteriocinas. A interação entre o péptido e o sistema manose-fosfotransferase leva a uma abertura permanente deste recetor e, deste modo, ocorre uma permeabilização da membrana e induz o extravasamento de iões e metabolitos celulares, a despolarização do potencial transmembranar e, conseqüentemente, a diminuição da regulação osmótica, inibição da respiração e por fim, ocorre a rutura da membrana e lise celular. Adicionalmente, a permeabilização da membrana permite a translocação de péptidos tóxicos para o citoplasma onde se localizam os organelos celulares que servem de alvo, o que pode influenciar a integridade do DNA e RNA, a síntese proteica e a atividade enzimática (200,203).

Relativamente às bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-negativas, mais especificamente as microcinas que podem exercer a sua atividade antibacteriana por via de dois tipos de mecanismos (203). No primeiro mecanismo ocorre a formação de poros na membrana interna da bactéria, como no caso das microcinas E492, M e H47, e no segundo mecanismo as enzimas intracelulares são o alvo, sendo que este último mecanismo pode ser observado nas microcinas J25, B17 e C (203,204). As microcinas, em contraste com as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, não necessitam de entrar nas células alvo para se obter o efeito antibacteriano, visto que, são utilizados recetores específicos presentes na membrana externa de estirpes sensíveis como, por exemplo, os recetores envolvidos na captação de ferro e as porinas que se encontram na membrana externa das bactérias. Deste modo, o sistema de transporte dos sideróforos é utilizado para importar as microcinas. Por exemplo, as microcinas E492, M, H47 e J25 têm como alvo os recetores de captação de ferro, como FepA, Cir, Fiu e FhuA, respetivamente (203,204). As microcinas que levam à formação de poros realizam esta ação através da interação com componentes específicos da membrana interna, como no caso da microcina E492 que interage com o componente que atua na absorção da manose, a permease Man-XYZ. Relativamente às microcinas que têm como alvo as enzimas intracelulares, mais especificamente a microcina J25, onde a sua captação é mediada pelo sistema de transporte dos sideróforos e uma vez dentro da célula, esta bacteriocina inibe a RNA polimerase. Por outro lado, as microcinas C e B17 utilizam a proteína membranar OmpF da membrana externa como um canal para atravessar o espaço periplasmático das bactérias alvo. Posteriormente, a microcina B17 utiliza os recetores SdaC e SbmA da membrana interna para entrar na célula e a sua atividade antibacteriana resulta da inibição da DNA girase e, conseqüentemente, inibe a replicação do DNA. As colicinas têm um mecanismo de ação semelhante ao das microcinas, onde pode ocorrer a formação de poros na membrana plasmática ou através da degradação enzimática intracelular de alvos específicos. Estes péptidos também utilizam recetores específicos localizados na membrana externa das Gram-negativas para entrarem na célula. As colicinas da subclasse I geralmente interagem com dois recetores da membrana externa, primeiro com

BtuB, no caso da colicina A e E, ou o recetor Tsx para a colicina K, e de seguida, os péptidos interagem com a OmpF que funciona como um translocador, sendo que, a translocação através de OmpF é dependente do sistema Tol-Pal que se encontra no espaço periplasmático da bactéria. No caso das colicinas da subclasse II, como a colicina B e D, estas interagem com um recetor para atravessarem a membrana externa e de seguida são translocadas pelo sistema TonB através da membrana interna. As colicinas que levam à formação de poros, por exemplo, as colicinas A, K e N, desempenham a sua função através de despolarização da membrana plasmática. No caso das colicinas com atividade enzimática, estas catalisam a degradação de compostos essenciais para a sobrevivência das bactérias, como o DNA, o ácido ribonucleico de transferência (tARN) e ácido ribonucleico ribossomal (rARN). As bacteriocinas com cauda de fago, mais especificamente a F-piocina e R-piocina, têm como mecanismo antibacteriano a despolarização da membrana com posterior formação de poros na célula alvo (203).

### **6.2.2 A aplicação das Bacteriocinas na área da Saúde**

As propriedades antibacterianas das bacteriocinas permite que estas possam ser utilizadas em diversas áreas, como em produtos cosméticos, nos alimentos, no material de acondicionamento dos produtos farmacêuticos e para prolongar a vida útil e o prazo de validade dos alimentos. Recentemente, as bacteriocinas têm recebido maior atenção para o uso clínico e como agentes imunomoduladores (202,205).

O uso de bacteriocinas isoladamente ou em conjugação com antibióticos consiste numa área de investigação importante, especialmente para o uso de bacteriocinas na indústria farmacêutica. Efetivamente, estes péptidos apresentam diversos espectros de atividade antibacteriana, que depende da estrutura da bacteriocina e das suas propriedades físico-químicas. Certas bacteriocinas têm atividade antibacteriana especificamente contra espécies intimamente relacionadas com a bactéria produtora, enquanto outras podem apresentar um espectro alargado de ação (203).

O uso clínico das bacteriocinas deve ter em consideração diversos fatores, como os parâmetros farmacocinéticos, o espectro de ação e a toxicidade. Os parâmetros farmacocinéticos, como a biodisponibilidade, a estabilidade, a solubilidade em condições fisiológicas e a sua suscetibilidade à proteólise enzimática na corrente sanguínea, são critérios importantes para determinar a eficácia das bacteriocinas.

A via de administração das bacteriocinas é outro aspeto que deve ser abordado com especial cuidado, visto que, as condições do trato gastrointestinal humano são muito variáveis e é necessário ter em atenção as enzimas digestivas, o tamanho das partículas de alimentos, presença de sais e bÍlis (206,207). Deste modo, para a administração por via oral das bacteriocinas é necessário ter em conta diversas variáveis em relação à atividade destes péptidos, como o tempo de semi-vida no TGI, a absorção intestinal e biodisponibilidade, a estabilidade a valores de pH ácido, interação com resíduos de alimentos e com outros microrganismos presentes neste sistema, a sua resistência às enzimas digestivas e à *clearance* renal (205,206).

As bacteriocinas ao serem administradas por via oral são expostas a variações de pH e à degradação proteolítica, o que pode dificultar a sua administração por esta via, na **Figura 6.1** estão indicados os fatores que podem influenciar a atividade das bacteriocinas no TGI (202,205,206,208). Por exemplo, foi verificada a inativação e digestão da nisina A por parte de proteases intestinais (209). Alternativamente, estes péptidos podem ser administrados por via parentérica e assim, evitar a degradação proteolítica, no entanto, a eficácia das bacteriocinas pode ser reduzida devido às proteases que intervêm na hemóstase e na fibrinólise na corrente sanguínea. Por um lado, o nanoencapsulamento, por exemplo, com nanopartículas à base de lípidos, das bacteriocinas poderá proteger estes compostos da degradação enzimática e, portanto, aumentar a sua estabilidade no TGI (208). Foi observado que a incorporação da nisina em duas matrizes diferentes à base de amido protegeu o péptido da degradação no TGI superior (210). Por outro lado, podem ser utilizadas outras vias de administração como a via intranasal, intragástrica, intraperitoneal, subcutânea e tópica, onde é necessário ter em consideração a duração do efeito farmacológico, a eficácia e os efeitos adversos. A aplicação tópica de duas bacteriocinas, a garvicina KS e a micrococina P1, em modelos de murganho com infeção dérmica, resultou num efeito antibacteriano significativo e os animais não apresentaram alterações no seu comportamento ou qualquer efeito tóxico (208,211).

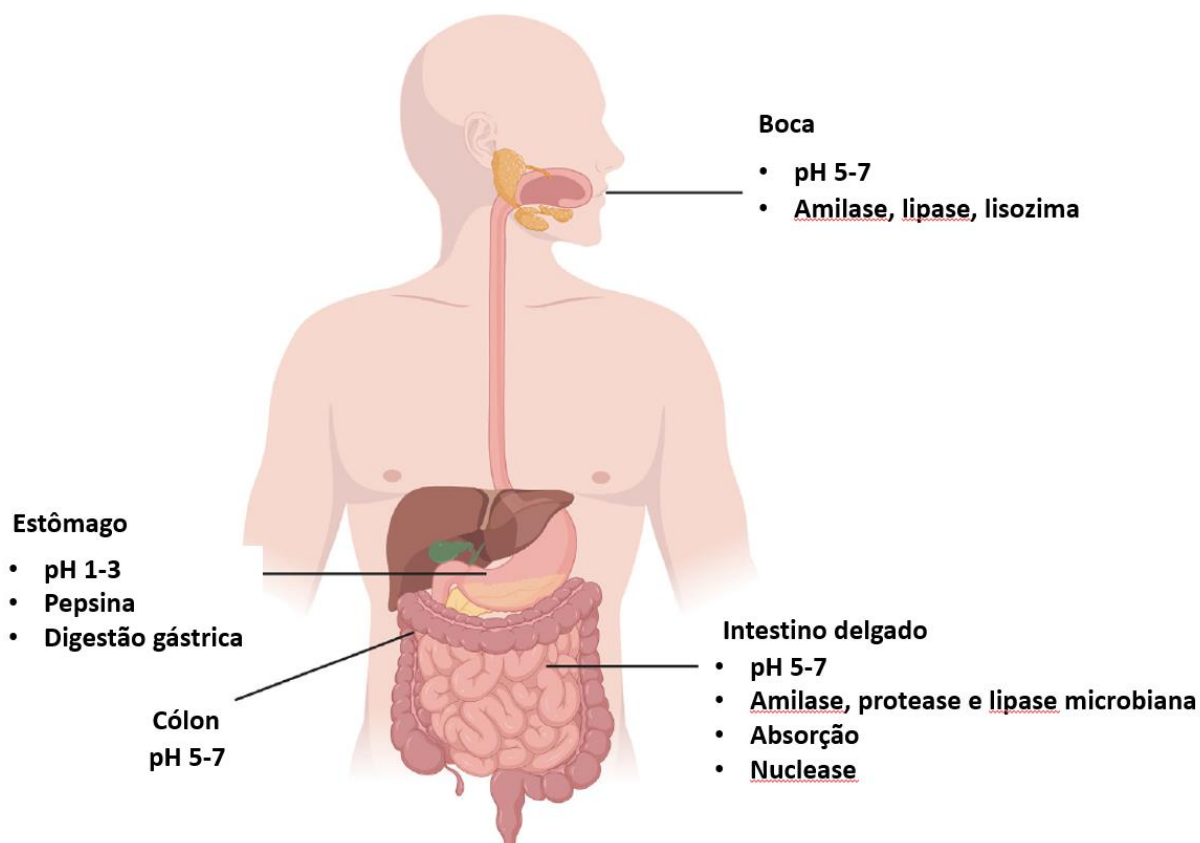
As bacteriocinas revelam diversas vantagens comparativamente à terapêutica tradicional com antibióticos. Em primeiro lugar é importante referir que a atividade antibacteriana é observada a concentrações muito baixas em comparação com os antibióticos, geralmente na gama de concentrações nanomolares (212,213). Por outro lado diversas bacteriocinas têm a capacidade de atuar em células quiescentes e em células em divisão (212). Adicionalmente, o espectro restrito de atividade das bacteriocinas pode ser uma vantagem, dado que, diminui os efeitos adversos na microbiota e diminui a probabilidade de desenvolvimento de resistências. No entanto, antes do início do tratamento é necessário que a bactéria causadora da infeção seja identificada para que a terapêutica tenha sucesso e, por conseguinte, ter em consideração que a terapêutica com bacteriocinas consome mais tempo que o tratamento com antibióticos (202,205,206,212). Apesar das vantagens, algumas bacteriocinas podem manifestar atividade imunogénica, o que pode dificultar o seu uso em infeções sistémicas (205). Outro aspecto é que estes péptidos, de modo geral, não são considerados tóxicos, mas alguns estudos demonstraram que a elevadas concentrações podem causar citotoxicidade para diversas linhas celulares (205,214).

Uma das desvantagens está associada aos métodos de produção das bacteriocinas purificadas que não são os mais apropriados, visto que, são processos lentos e dispendiosos. Tradicionalmente, as bacteriocinas purificadas são produzidas por fermentação em lote com a estirpe produtora, no entanto, este método necessita de componentes específicos que dependem do tipo de bacteriocina que se pretende produzir, o que dificulta a produção de uma variedade de bacteriocinas em larga escala (205,206).

Vários estudos demonstraram a utilidade das bacteriocinas na área clínica, por exemplo, foi reportada a atividade da nisina em conjunto com polimixinas contra biofilmes produzidos pela bactéria *P. aeruginosa* (200,215). Foi ainda relatado que a nisina é capaz de penetrar o

biofilme, sendo útil na prevenção e eliminação das comunidades bacterianas em biofilme que colonizam dispositivos médicos invasivos (críticos) (216). Foi ainda observado que a nisina F é eficaz no tratamento de infecções pulmonares causadas pela bactéria *S. aureus* em modelos de murganho, e ainda a mersadicina foi capaz de eliminar a colonização por MRSA no modelo de rato com rinite (200,217).

Apesar das vantagens são necessários estudos adicionais para estabelecer métodos para aprimorar a estabilidade e a potência das bacteriocinas para aplicação na área da saúde.



**Figura 6.1** – Fatores que podem influenciar a atividade biológica e a estabilidade das bacteriocinas através do trânsito no trato gastrointestinal (Adaptado de (205)).

### 6.2.3 Mecanismo de resistência às bacteriocinas

As bactérias podem não só apresentar resistência aos antibióticos como também podem desenvolver resistência às bacteriocinas, sendo que esta resistência pode igualmente ser inata, quer ao nível de género ou espécie, ou pode ocorrer o desenvolvimento de resistência adquirida a um péptido antibacteriano numa determinada estirpe bacteriana ao qual era previamente suscetível. Os mecanismos de resistência às bacteriocinas incluem: i) inativação enzimática por peptidases (elastase e metaloprotease); ii) alterações no alvo das bacteriocinas; iii) filamentação bacteriana; iv) captura por moléculas secretadas que se ligam e neutralizam as bacteriocinas; v) alterações na superfície celular que confere impermeabilidade aos péptidos antibacterianos; vi) modificações químicas de lipopolissacarídeos, nomeadamente o lípido A, das bactérias Gram-negativas; vii) D-alanilação dos ácidos teicóicos das bactérias Gram-positivas para diminuir as cargas negativas da sua

superfície; viii) produção de cápsula para impedir o contacto entre a superfície bacteriana e as bacteriocinas; e, por último, ix) bombas de efluxo (200,202,205).

No caso da bacteriocina nisina, as bactérias resistentes apresentam diversos mecanismos de resistência, como alterações da parede celular, alterações da membrana plasmática e perda ou redução dos recetores da bacteriocinas (218–220). Adicionalmente, os transportadores ABC e os sistemas reguladores de dois componentes envolvidos nas respostas ao stresse também podem estar relacionados direta ou indiretamente com a resistência à nisina em algumas espécies bacterianas (219). Por exemplo, foi descoberto que a resistência a esta bacteriocina pela bactéria *C. difficile* está associada aos transportadores ABC, mais concretamente o sistema Cpr (221). Este sistema intervém na resistência a diversos lantibióticos sendo composto por um transportador do tipo ABC e um sistema de dois componentes que se assemelha ao sistema de imunidade observado em estirpes bacterianas produtoras de lantibióticos. O sistema Cpr é composto por três proteínas diferentes: a CprA, que constitui o local de ligação de nucleótidos e os dois domínios transmembranares denominados CprB e CprC, a histidina quinase e o regulador de resposta, respetivamente. O aumento na expressão do transportador ABC conduz a uma maior exportação das bacteriocinas (218). Num outro estudo, foi verificado que a resistência à nisina A na bactéria *S. aureus* está associada a uma mutação no gene *pmtR*, que codifica para um regulador transcricional responsável pela expressão do operão *pmtABCD*. Este operão codifica o transportador responsável pela secreção de fatores de virulência e, deste modo, esta mutação leva a um aumento na expressão de *pmtABCD* e, conseqüentemente, afeta a virulência desta bactéria e leva à resistência a nisina A (218,222).

As bacteriocinas podem ter mecanismos de ação distintos relativamente aos antibióticos, o que pode diminuir o risco de desenvolvimento de resistência cruzada, em adição, a combinação de antibióticos e bacteriocinas com diferentes mecanismos de ação pode aumentar a sua potência antibacteriana e simultaneamente reduzir o risco de desenvolvimento de resistências (200,205). No entanto, a possibilidade de ocorrer transferência horizontal de genes através da transformação, conjugação ou transdução que de alguma forma modifique a parede celular, a membrana plasmática, recetores e outros sistemas essenciais constitui um alerta relativamente ao uso de bacteriocinas concomitantemente com antibióticos, visto que, pode ocorrer resistência cruzada provocando a criação de variantes bacterianas resistentes a antibióticos e a bacteriocinas (200,205).

### 6.3 Vacinas

No século 20, as vacinas e as técnicas de imunização foram introduzidas ao público globalmente, após o desenvolvimento da vacina contra o sarampo por Edward Jenner em 1798 (223,224). O modo de operação das vacinas consiste em “treinar” o sistema imunitário para reconhecer e desenvolver uma resposta rápida e eficiente contra o agente patogénico alvo, tendo em vista, prevenir o desenvolvimento de uma infeção ou diminuir a severidade de uma doença. A partir desse momento, a vacinação tornou-se um tratamento preventivo difundido mundialmente, que contribuiu para o controlo de 16 doenças, designadamente, a

difteria, doenças pneumocócicas e meningocócica, febre amarela, febre tifoide, gripe, hepatite B, papeira, poliomielite, raiva, rotavírus, rubéola, sarampo, tosse convulsa, tétano e varíola. Adicionalmente, foi alcançada a erradicação total ou parcial do sarampo e da poliomielite, respetivamente (224–226).

### **6.3.1 Benefícios das vacinas no combate contra a resistência aos antibióticos**

As vacinas podem proporcionar um contributo importante no combate à resistência aos antibióticos, visto que, as vacinas têm como objetivo a prevenção de doenças sendo administradas profilaticamente. Deste modo, a administração profilática das vacinas permite que o hospedeiro desenvolva uma resposta imunitária antes de entrar em contacto com o agente patogénico, ou até mesmo na fase inicial da infeção. Adicionalmente, as vacinas têm um impacto mínimo nos microrganismos, com exceção da estirpe alvo e, deste modo, as vacinas não interferem com a microbiota intestinal, diminuindo o desenvolvimento de resistências (224,226,227).

O desenvolvimento de resistência aos antibióticos após a administração de vacinas é um acontecimento previsível, no entanto, o desenvolvimento de resistências neste caso é extremamente raro. Por um lado, isto pode ocorrer, dado que, as vacinas são administradas com o objetivo de prevenir a doença, e não com um objetivo terapêutico, pelo que as vacinas conseguem prevenir o desenvolvimento de doenças após a exposição ao agente patogénico o que, conseqüentemente, diminui a possibilidade de mutação das bactérias para uma estirpe resistente e contribui na redução da disseminação de genes de resistência para outras bactérias. Por outro lado, os antibióticos são geralmente prescritos após o desenvolvimento da infeção e quando a bactéria está presente e, deste modo, a probabilidade de desenvolvimento de mutações que conferem resistência aos antibióticos é mais elevada. Em adição, as vacinas são benéficas para as pessoas não vacinadas, visto que, providenciam proteção através do fenómeno de imunidade de grupo, reduzindo o risco de infeção na comunidade e protege as pessoas mais vulneráveis como os recém-nascidos, os imunocomprometidos e os idosos (225,226).

As vacinas virais também podem contribuir para mitigar a resistência aos antibióticos. Por exemplo, diversos casos de doenças febris fazem surgir sintomas semelhantes à febre tifoide, mas geralmente têm causas virais onde o uso de antibióticos não é adequado. Deste modo, o uso exagerado e inadequado de antibióticos exerce uma pressão seletiva sobre as bactérias, facilitando o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antibióticos. A suspeita de febre tifoide é um dos maiores contribuidores para o uso excessivo de antibióticos no sul da Ásia, no entanto, com a introdução de novas vacinas conjugadas contra a febre tifoide que são eficazes em crianças com mais de 6 meses, considera-se que os hábitos de prescrição possam ser alterados e diminuir, assim a resistência aos antibacterianos (226,228,229). A gripe, que provoca sintomas do trato respiratório superior, também é muitas vezes associada à prescrição inapropriada de antibióticos. Foi reportado que a vacina contra gripe diminui a duração do tratamento com agentes antibacterianos em adultos saudáveis e também o uso

destes fármacos em crianças com idades entre 6 meses a 14 anos (224,226,230). Adicionalmente, a administração de vacinas virais diminui a probabilidade da ocorrência de infeções bacterianas secundárias, como pneumonia e otite média e, conseqüentemente, diminui a utilização de antibióticos para o tratamento destas condições (224–226). Num estudo realizado na Europa, em crianças entre os 6 e 35 meses, foi observada uma diminuição de 50% nas prescrições de antibióticos e uma diminuição de 47% nas infeções por *Haemophilus influenzae* após a administração de uma vacina quadrivalente da gripe durante cinco estações consecutivas (229,231).

A administração de vacinas previne o desenvolvimento e disseminação de infeções pela população e, deste modo, diminui o uso de antibióticos que poderiam ser utilizados para o tratamento de infeções e, portanto, diminui indiretamente o risco de desenvolvimento de resistências. As infeções provocadas pela bactéria *S. pneumoniae* são uma das principais causas para a mortalidade infantil, a hospitalização e para o uso de antibióticos. No ano 2000 foi introduzida uma vacina pneumocócica conjugada com sete sorotipos nos EUA para o plano de vacinação infantil. Em 2007, os casos de infeções provocadas por todos os serotipos diminuíram cerca de 76% em crianças com menos de 5 anos e em 37% em adultos com idade superior a 65 anos. No entanto, os casos de doença provocados por serotipos não incluídos na vacina começaram a tornar-se mais proeminentes. A seguir, em 2010, a vacina foi substituída por outra com mais seis serotipos adicionais que reduziu os casos de infeção pneumocócica e a mortalidade (226,232). Estas duas vacinas reduziram a prevalência de pneumococos pouco suscetíveis à penicilina e, deste modo, diminui a disseminação de estirpes resistentes (224,226). Por exemplo, a introdução da vacina pneumocócica no sul de África permitiu reduzir o número de casos de *S. pneumoniae* resistente à ceftriaxona, penicilina e outras estirpes multirresistentes em crianças com 2 anos (226,233). No entanto, as estirpes desta bactéria conseguem adaptar-se através da substituição do serotipo específico da vacina por um serotipo que não se encontra coberto na vacina através de mecanismos como a modificação da componente da cápsula (226,234).

No combate à resistência aos antibióticos, através de vacinas é necessário que o seu desenvolvimento seja focado nas espécies bacterianas que desenvolvem resistências aos antibacterianos muito facilmente e rapidamente, como a bactéria *S. aureus*, visto que, estes agentes patogénicos causam infeções frequentes, com necessidade de recurso a antibióticos e cujas resistências trazem complicações à terapêutica.

O desenvolvimento de vacinas é muitas vezes dificultado devido a diferentes fatores, tais como: i) pouco conhecimento sobre as respostas imunológicas à infeção; ii) fatores de virulência de alguns agentes patogénicos ainda pouco compreendidos; iii) falta de adjuvantes autorizados e métodos de administração adequados para obtenção da resposta pretendida; e iv) a diversidade em antígenos e variações de fase de certas bactérias. Por outro lado, o financiamento necessário para o seu desenvolvimento, análise e licenciamento é considerável, o que também pode dificultar o desenvolvimento de novas vacinas. Outra limitação está relacionada com a imunização conferida pelas vacinas que só protege os indivíduos de serem infetados por determinados serotipos e, geralmente, não são úteis em doentes já infetados (226,227)

Deste modo, é necessário que a comunidade científica realize uma vigilância contínua de estirpes resistentes e tenha como prioridade um maior investimento em vacinas que podem ter um maior impacto no combate à resistência aos antibióticos (229,235).

### **6.3.2 Desenvolvimento de novas vacinas contra bactérias resistentes**

As vacinas direcionadas aos agentes infecciosos que apresentam resistência aos antibióticos têm o potencial de prevenir ou minimizar a mortalidade, os custos de saúde e diminuir o uso de agentes antibacterianos. As vacinas existentes conseguem contribuir para a mitigação de infecções provocadas por agentes patogênicos resistentes, como a bactéria *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Existem ainda vacinas em desenvolvimento contra bactérias que apresentam resistência aos antibióticos, como *C. difficile*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Salmonella Typhi* (227,236).

Como já foi referido a bactéria *S. aureus* tem uma elevada capacidade de adaptação e é resistente a diversas classes de antibióticos e, por isso, é importante o desenvolvimento de vacinas eficazes para diminuir o risco de doença. Apesar das tentativas de desenvolvimento de vacinas para esta bactéria, até agora não foi desenvolvida qual vacina licenciada para prevenir a infecção por *S. aureus*. Existe uma vacina de 4 antígenos, SA4Ag, em desenvolvimento, na fase 2/3 dos ensaios clínicos para a prevenção da doença invasiva por *S. aureus* em doentes selecionados para cirurgia da coluna vertebral (237). A SA4Ag demonstrou ser segura e bem tolerada na fase inicial dos ensaios clínicos, em adição, induz níveis elevados de anticorpos contra esta bactéria em adultos saudáveis (225,238). Outro exemplo de vacinas em desenvolvimento é o caso da bactéria *K. pneumoniae* que num estudo *in vivo* onde foram utilizados glicoconjugados semissintéticos para o tratamento de infecções por estirpes resistentes aos carbapenemos que demonstrou ser eficaz, onde os anticorpos produzidos induzem a fagocitose da bactéria em ratos e coelhos (239,240).

## **6.4 Produtos de origem vegetal**

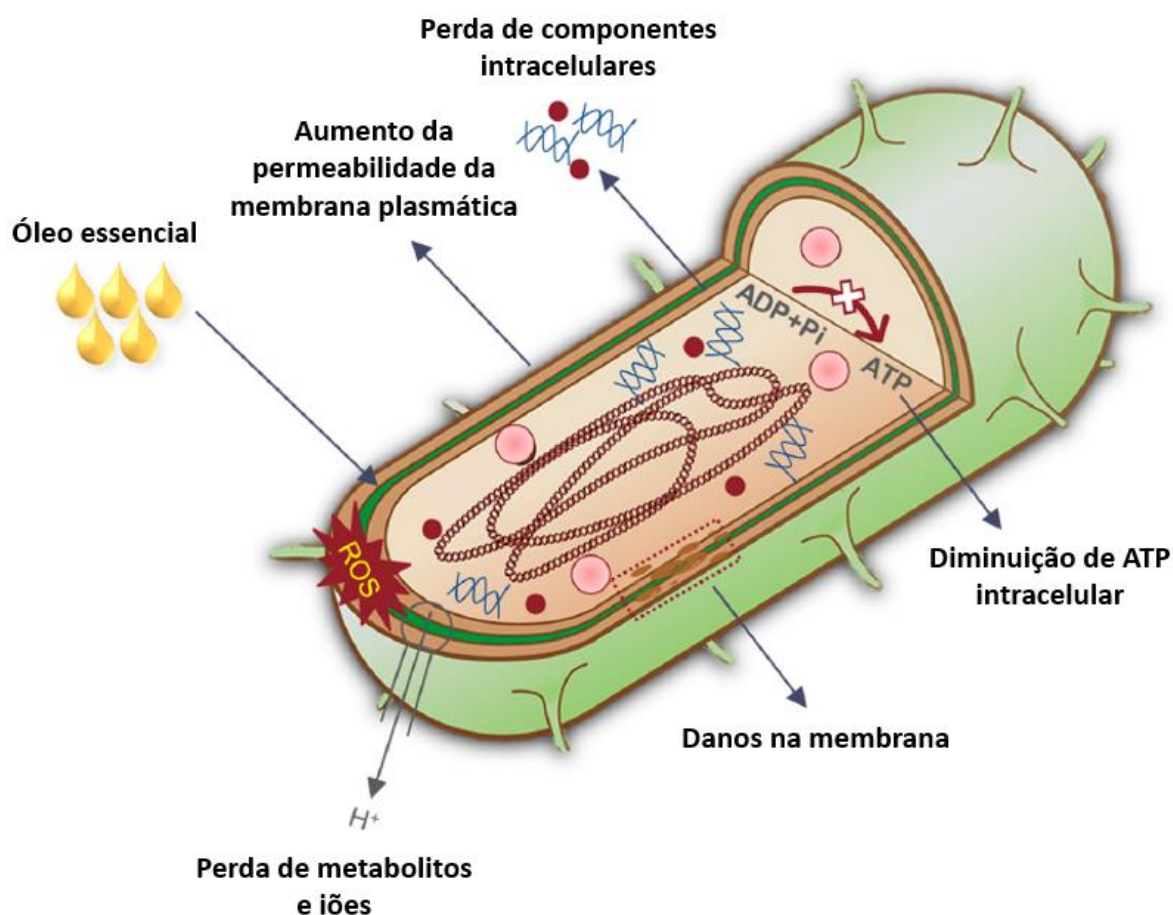
### **6.4.1 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são metabolitos secundários de plantas aromáticas e medicinais que atribuem características de aroma e sabor distintos às plantas. Estes compostos são definidos como substâncias oleosas, aromáticas e voláteis presentes em diversas partes das plantas, como na casca, frutas, polpa e sementes (241,242). Os óleos essenciais são produzidos por plantas aromáticas que pertencem a diversos grupos taxonómicos, como, por exemplo, as plantas das famílias *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae* e *Zingiberaceae*. São uma mistura complexa constituída por diversos compostos, como terpenos, terpenóides, fenóis, aldeídos e, também podem conter compostos como ácidos gordos, óxidos e derivados de enxofre (243,244). Os seres humanos têm utilizado os óleos essenciais desde a Antiguidade, como ingredientes de perfumes ou como especiarias em alimentos e, especialmente, na medicina tradicional devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais.

Deste modo, estes metabolitos secundários têm sido alvo de estudos para explorar a sua utilização no combate à resistência aos antibióticos (244–246).

#### 6.4.1.1 Mecanismos de ação

O mecanismo de ação dos óleos essenciais depende da sua composição e da sinergia entre os seus componentes principais. Estes óleos também apresentam múltiplos modos de ação, visto que, cada componente pode afetar vários alvos celulares num único microrganismo. Os componentes dos óleos essenciais podem interferir com a atividade bacteriana das seguintes formas: i) degradação dos fosfolípidos da membrana celular e no caso das bactérias Gram negativas afetar os lipopolissacarídeos da membrana externa; ii) alteração da composição em ácidos gordos; iii) alterações na permeabilidade da membrana; iv) interferência com a absorção da glucose, v) inibição da atividade enzimática, vi) inibir o sistema de percepção de quórum (QS) (241,246–248). Os diversos mecanismos de ação dos óleos essenciais encontram-se exemplificados na **Figura 6.2**.



**Figura 6.2** – Mecanismos de ação antibacterianos dos óleos essenciais (Adaptado de (241))

As bactérias Gram-positivas são possivelmente mais suscetíveis aos efeitos antibacterianos devido à hidrofobicidade dos óleos essenciais (241,249). Esta diferença de

atividade é devido à presença, nas bactérias Gram-positivas, de uma espessa camada de peptidoglicano ligado a outras moléculas hidrofóbicas, como proteínas e ácido teicóico. Esta membrana hidrofóbica pode facilitar a entrada de moléculas hidrofóbicas, como os óleos essenciais. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa mais complexa que é constituída por proteínas e lipopolissacarídeos, os quais proporcionam uma maior proteção contra os componentes dos óleos essenciais (241). No entanto, alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais reportaram diferenças mínimas nos valores da concentração mínima inibitória (MIC) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (241,250).

Como for referido acima as moléculas de óleos essenciais podem ter como alvos os elementos principais da parede celular bacteriana e as enzimas associadas às membranas plasmáticas. Certos óleos essenciais interferem com a estrutura da membrana através de alterações na sua permeabilidade, como, por exemplo, o ácido cinâmico que dissolve facilmente a cadeia de ácidos gordos da membrana celular e degrada a membrana externa e, conseqüentemente, aumenta a permeabilidade da membrana plasmática, a saída de adenosina trifosfato (ATP), o que contribui para a morte celular (247,251,252). Foi reportado que o óleo essencial de alfazema conduz à oxidação da membrana externa da bactéria *K. pneumoniae* provocando stresse oxidativo no microrganismo (246,253). O aumento da permeabilidade da membrana pode, posteriormente, levar à perda do conteúdo intracelular como iões de hidrogénio e iões de potássio, proteínas e o cromossoma bacteriano (246,254). Foi observado que o óleo essencial da planta *Origanum compactum* provocou uma perda do conteúdo intracelular da bactéria *B. subtilis* devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática e, subsequente, lise celular (254).

O ATP é uma fonte de energia encontrada em todos os organismos, como as bactérias, sendo essencial para processos metabólicos (246). A quantidade desta molécula energética pode ser reduzida por certos óleos essenciais, como é o caso do óleo de canela (*Cinnamomum* sp.) e o seu componente, o ácido cinâmico que diminuíram o valor de ATP intracelular na bactéria *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* (246,255).

O sistema de QS é um mecanismo regulador da comunicação na colónia bacteriana, onde as bactérias produzem e segregam moléculas sinalizadoras que possibilitam a noção acerca da densidade bacteriana no ambiente circundante (247,256). A inibição deste mecanismo pode levar a conseqüências nas funções bioquímicas e fisiológicas das bactérias como, por exemplo, a formação de biofilme, secreção de enzimas extracelulares, produção de antibióticos e de fatores de virulência (247). Num estudo realizado por Wang et al. (256) relativamente à atividade inibitória do sistema de percepção de quórum do óleo essencial da planta *Cinnamomum camphora*, foi reportado que este óleo essencial diminuiu significamente a produção de uma molécula regulada pelo sistema QS, a violaceína, pela bactéria *C. violaceum*, com uma taxa de inibição máxima de 63% (256).

### 6.4.1.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais depende da sua composição química e da concentração de cada componente (247,248). O efeito dos diferentes óleos e seus componentes tem sido avaliado em diferentes bactérias patogênicas, quer Gram-positivas como, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* quer bactérias Gram-negativas como, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* e *Campylobacter* spp (257–262). Foi reportado que a atividade antimicrobiana do óleo essencial da planta *Thymus capitatus* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi eficaz contra todas as estirpes, com exceção da bactéria *P. aeruginosa*. A bactéria que demonstrou maior suscetibilidade foi *Bacillus cereus* com um halo de inibição de  $50 \pm 4,25$  mm (263,264). O óleo essencial desta planta também demonstrou atividade antibacteriana potente contra a bactéria *E. coli* ( $54 \pm 0,51$  mm), *Proteus mirabilis* ( $52 \pm 0,39$  mm), *K. pneumoniae* ( $50 \pm 0,56$  mm) e *S. aureus* ( $42 \pm 0,54$  mm), mas a bactéria *P. aeruginosa* demonstrou baixa sensibilidade a este óleo com um halo de inibição de  $11 \pm 0,73$  mm (263,265). Na **Tabela 6.1** estão sumarizados alguns resultados de estudos sobre a avaliação da ação antibacteriana de diferentes óleos essenciais(266).

**Tabela 6.1** – Atividade antibacteriana de alguns óleos essenciais.

Planta/óleo essencial	Bactéria	MIC	Referência(s)
<i>Cuminum cyminum</i> L.	<b>MRSA</b>	<b>580 µg/ml</b>	(267)
	<i>E. coli</i>	<b>290 µg/ml</b>	
	<i>E. coli</i> resistente à ciprofloxacina	<b>290 µg/ml</b>	
<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>S. pneumoniae</i> resistente às fluoroquinolonas	<b>1150-4600 µg/ml</b>	(268)
	<i>S. aureus</i>	<b>290 µg/ml</b>	(267)
	<b>MRSA</b>	<b>580 µg/ml</b>	
	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina	<b>580 µg/ml</b>	
	<i>E. coli</i> resistente à ciprofloxacina	<b>290 µg/ml</b>	
<i>Pimenta dioica</i>	<i>A. baumannii</i>	<b>500 µg/ml</b>	(269)
	<b>MRSA</b>	<b>500 µg/ml</b>	
	<i>P. aeruginosa</i>	<b>500 µg/ml</b>	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>A. baumannii</i>	<b>500 µg/ml</b>	(269)
<i>Thymus daenensis</i> Celak.	<i>S. pneumoniae</i> resistente às fluoroquinolonas	<b>587 – 2348 µg/ml</b>	(268)
<i>E. camaldulensis</i>	<i>S. aureus</i>	<b>0,1 µg/ml</b>	(270)
	<i>A. baumannii</i>	<b>0,1 µg/ml</b>	
	<i>E. coli</i>	<b>0,15 µg/ml</b>	
	<i>P. aeruginosa</i>	<b>0,2 µg/ml</b>	

Tem sido reportada a ação de óleos essenciais e dos seus componentes contra biofilmes bacterianos (271–273). O efeito do óleo essencial da planta *T. vulgaris* foi estudado contra a estirpe bacteriana MRSA isolada da cavidade oral de doentes com periodontite e faringite (271). Neste estudo foi reportada uma redução de 53% do biofilme após a exposição ao óleo essencial com uma concentração de 0,01% (v/v), enquanto, a concentração mais elevada (0,05%, v/v) provocou uma diminuição de 76% do biofilme (271). Adicionalmente, o componente principal do óleo essencial de *T. vulgaris*, o timol, demonstrou não só a capacidade de inibir a formação de biofilme, mas igualmente de eliminar o biofilme maduro formado pela bactéria MRSA. O mecanismo descrito para esta ação do timol foi a sua capacidade de inibição da síntese de compostos importantes para o biofilme, nomeadamente, o DNA extracelular e a adesina de polissacarídeo intracelular (272,274).

No estudo realizado por Rosca et al (275) foi analisado o efeito antibacteriano do óleo essencial da planta *Thymbra capitatae* e do antibiótico metronidazol em biofilme polimicrobiano com 6 espécies bacterianas associadas à vaginose bacteriana em modelos *in vivo* e *ex vivo* de tecido vaginal. O biofilme produzido inclui espécies bacterianas associadas à vaginose bacteriana como, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Fannyhessea vaginae* ATCC BAA-55, *Lactobacillus iners* CCUG 28746, *Mobiluncus curtisii* ATCC 35241, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, e *Prevotella bivia* ATCC 29303. Neste estudo foi reportado que 4 das 6 espécies bacterianas não apresentaram suscetibilidade ao antibiótico, nomeadamente, as bactérias *G. vaginalis*, *F. vaginae*, *L. iners* e *M. curtisii*, enquanto, o óleo essencial da planta *T. capitata* demonstrou um elevado efeito antibacteriano com redução significativa na biomassa do biofilme. O efeito bacteriano exibido pelo óleo essencial foi variável para as espécies bacterianas presentes no biofilme, com um MIC de 0,63 µL.mL<sup>-1</sup> e de 0,31 µL.mL<sup>-1</sup> para as bactérias *P. anaerobius*, *G. vaginalis*, *L. iners* e *P. bivia*, respetivamente, e um MIC de 0,16 a 0,31 µL.mL<sup>-1</sup> para as bactérias *F. vaginae* e *M. curtisii* (275).

No estudo conduzido por Apolónio et al (273) foi reportado que, quer o componente eugenol quer o componente citral na concentração subinibitória (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>) inibiram de modo significativo a capacidade de aderência das estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, MRSA 4 e MRSA 12 e *L. monocytogenes* EGD, Scott A e C882, ao passo que o composto clorexidina não inibiu qualquer uma das estirpes bacterianas.

Foi igualmente reportado no estudo de Apolónio et al (273) que a exposição das estirpes de *S. aureus*, MRSA e *L. monocytoges* aos componentes eugenol e citral não induziu o desenvolvimento de resistências, quer aos próprios componetes quer aos antibióticos testados (canamicina, eritromicina, penicilina, cloranfenicol).

No seu conjunto estes resultados evidenciam o potencial de aplicação de óleos essenciais no combate às infeções bacterianas com a vantagem da ausência de desenvolvimento de resistências.

#### 6.4.1.3 Combinação com antibióticos

A combinação de óleos essenciais com antibióticos é uma abordagem inovadora no combate contra as bactérias multirresistentes. A terapêutica combinada pode levar a três tipos de efeitos, como um efeito de sinergismo ou antagonismo ou ainda um efeito aditivo (246,276). O efeito sinérgico é quando o efeito resultante da combinação entre duas substâncias é superior à soma dos efeitos individuais, o que traz efeitos benéficos no combate à resistência aos antibióticos (246,277). Deste modo, as interações sinérgicas podem levar a um aumento da eficácia ou a uma redução da dose efetiva e, conseqüentemente, resultar numa redução da probabilidade de efeitos adversos. A combinação sinérgica pode dificultar o desenvolvimento da resistência adaptativa por parte das bactérias devido à ação em múltiplos alvos (277). Diversos compostos dos óleos essenciais demonstraram capacidade para melhorar a eficácia e potência da ação dos antibióticos quando a sua utilização foi conjunta (246,276,277).

Os óleos essenciais e os antibióticos podem interagir sinérgicamente através de diversos mecanismos, como: i) ação simultânea em múltiplos alvos ou vias; ii) efeito farmacocinético ou farmacodinâmico e; iii) inibição dos mecanismos de resistência aos antibióticos nas bactérias (277).

As bactérias MRSA e *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases demonstraram um aumento da sensibilidade aos antibióticos amoxicilina, ampicilina, cefalaxina e cefuroxima após combinação com o óleo essencial da planta *Eucalyptus camaldulensis* (278,279). Diversos estudos demonstraram que certos óleos essenciais exercem um efeito inibitório nas bombas de efluxo responsáveis pela resistência aos antibióticos (280,281). A atividade do óleo essencial da planta *Chenopodium ambrosioides* foi estudada contra a estirpe IS-58 da bactéria *S. aureus* que apresenta as bombas de efluxo TetK responsável mecanismo de resistência ao antibiótico tetraciclina (280). A utilização de concentrações subinibitórias (1/4 MIC) deste óleo não demonstrou atividade antibacteriana relevante, no entanto, a sua combinação com agentes antibacterianos revelou efeito sinérgico (280). Deste modo, a sua administração concomitante com tetraciclina diminuiu em metade o MIC deste antibiótico. O aumento do efeito antibacteriano do fármaco pode ser atribuída à capacidade do óleo essencial em inibir a bomba de efluxo (280,282). No estudo realizado por De Medeiros et al. (283) foi avaliado o efeito do óleo extraído da planta *Croton growioides* em associação com os antibióticos tetraciclina e norfloxacin. Os antibióticos norfloxacin e tetraciclina quando administrados individualmente apresentaram MICs de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respetivamente. No entanto, na presença do óleo essencial, reportou-se que os MICs de tetraciclina e norfloxacin diminuíram 64 (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 4 (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) vezes, respetivamente (283). O composto principal do óleo, o  $\alpha$ -pineno, atua como modulador da resistência à tetraciclina através da redução da atividade da bomba de efluxo NorA até 32 vezes. Desta forma, o óleo essencial de *C. growioides* e o seu componente principal são potenciais inibidores de bombas de efluxo em bactérias e, possíveis modificadores da resistência bacteriana aos antibióticos (283).

#### 6.4.1.4 Limitações

A descoberta de extratos de plantas medicinais é limitada por diversos fatores científicos, económicos e sociais que implica uma maior análise sobre o seu uso como alternativa ou adjuvante da terapêutica antibacteriana (284).

Referente aos fatores socioeconómicos, a primeira dificuldade surge na obtenção da matéria-prima. Inicialmente é necessário realizar a identificação correta por peritos da área. Estes profissionais também desempenham um papel importante na colheita, documentação e preparação da investigação de forma adequada, no entanto, estes especialistas são escassos. O processo de extração, apesar de revelar um rendimento elevado, a concentração em compostos ativos é reduzida, portanto, é necessário maior volume de matéria-prima. Todavia, é necessário ter em atenção que as plantas requerem um *habitat* específico para o seu crescimento e produção de metabolitos, dificultando o escalonamento da colheita. Adicionalmente, deve ser considerado o impacto da diminuição na quantidade de plantas nas cadeias alimentares e em outros seres vivos. Por último, o acesso às plantas medicinais pode ser difícil, visto que, é necessário ter em conta fatores políticos para a sua colheita, como regulamentos de importação e exportação e relações internacionais (284,285).

O principal fator científico a considerar é a qualidade da matéria-prima. Este componente é influenciado pela época da colheita, a qualidade do solo, possibilidade de contaminação ambiental, as partes das plantas utilizadas, tipo de armazenamento e o tipo de processamento. Deste modo, a comparação dos diferentes dados disponíveis na literatura relativos à atividade antimicrobiana de extratos de plantas pode ser desafiante devido à variação na composição dos extratos (284,285). A composição também pode sofrer alterações consoante o clima local e as condições como, por exemplo, o nível de precipitação e humidade depende da localização geográfica e, deste modo, pode ocorrer alterações na composição e produção de compostos ativos da mesma espécie de planta colhida em locais geográficos distintos. Por outro lado, as alterações climáticas também se apresentam como um desafio devido às variações das condições ambientais que contribuem para as variações na composição até nos mesmos locais geográficos (284,285).

A transição de estudos *in vitro* para estudos *in vivo* e, posteriormente, para ensaios clínicos em humanos também se apresenta como um grande desafio para o uso de extratos de plantas como antibacterianos, visto que, os mecanismos de ação não se encontram bem definidos para certos compostos. Adicionalmente, a ausência de informação oficial acerca da toxicidade dos extratos é preocupante devido aos possíveis efeitos adversos (284,285).

### 6.5 Estimulantes do sistema imunitário

#### 6.5.1 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAbs) são produtos biofarmacêuticos à base de imunoglobulinas modificadas em laboratório, que se ligam a determinados alvos no organismo, nomeadamente os antigénios presentes na superfície de células cancerígenas.

Existe uma grande diversidade de anticorpos monoclonais e cada tipo de proteína é desenvolvido para se ligar a um só antígeno. Atualmente, este tipo de anticorpos são maioritariamente utilizados para o diagnóstico e tratamento de diversas doenças, como, por exemplo, certos tipos de cancro (286). O uso de anticorpos foi proposto como uma estratégia para combater as infeções por bactérias multirresistentes (224,287).

Os principais mecanismos de ação dos mAbs antibacterianos são baseados na neutralização de toxinas, inibição de fatores de virulência e na estimulação do sistema imunitário do hospedeiro. Estas funções conseguem coordenar entre si e, desta forma, os mAbs conseguem eliminar os agentes patogénicos através de diferentes modos de ação (288), nomeadamente a neutralização de toxinas bacterianas, inibição de fatores de virulência e influencia na atividade das proteínas envolvidas na adesão, na evasão ao sistema imunológico e na biossíntese bacteriana (288).

Os anticorpos contra as toxinas bacterianas conseguem bloquear a ligação das toxinas aos recetores e, deste modo, previnem as alterações estruturais da toxina necessárias para a sua toxicidade e geram imunocomplexos que auxiliam na eliminação destes compostos tóxicos (288). Por exemplo, o bezlotoxumab tem como alvo a toxina TcdB da bactéria *C. difficile* e, este fármaco neutraliza a toxina ao ligar-se a dois locais distintos, a E1 e E2 (288,289). Atualmente, é utilizado na prevenção de recorrências de infeção por esta bactéria, no entanto, não é eficaz no tratamento da infeção ativa (288–291). No caso do mAb, Suvratoxumab (MEDI4893), este é capaz de neutralizar a toxina  $\alpha$ -hemolisina da bactéria *S. aureus* quando se liga aos seus recetores e inibe a formação de oligómeros através do impedimento estérico (288,290,292,293). Este tipo de anticorpos monoclonais são úteis na profilaxia ou como adjuvantes no tratamento com antibióticos, no entanto, a sua capacidade no tratamento direto da infeção na fase aguda é limitada (290).

Os anticorpos monoclonais também podem ter como alvo fatores de virulência específicos presentes na superfície celular bacteriana, diminuindo a sua patogenicidade. O mAb KB001-A que inibe o sistema de transporte do tipo III (T3SS) na superfície da bactéria *P. aeruginosa* e, deste modo, impede a introdução de toxinas no citoplasma da célula hospedeira tendo como alvo a proteína PcrV (288,294,295).

Estes produtos biofarmacêuticos podem ter como alvo as proteínas da membrana externa das bactérias Gram-negativas, nomeadamente, as proteínas envolvidas na adesão, na evasão ao sistema imunológico e na biossíntese bacteriana. Por exemplo, a proteína A da bactéria *S. aureus*, em condições normais, dificulta a ação do sistema imunitário ao se ligar à região Fc do anticorpo e previne a orientação adequada e, adicionalmente, induz a produção de imunoglobulinas menos eficientes por parte das células B. O anticorpo 514G3 impede que o fator de virulência se ligue à imunoglobulina G3. Ensaio clínico de fase 1 e 2 reportaram uma redução no período de hospitalização de doentes com bacteriemia provocada por MRSA (290,296).

Atualmente, existem três anticorpos monoclonais antibacterianos autorizados para uso clínico que neutralizam as exotoxinas produzidas por bactérias Gram-negativas (288).

A bactéria *Bacillus anthracis* tem como principal fator de virulência o complexo da toxina antrax, composto pelo fator letal (FL), fator de edema (FE) e pelo antigénio protetor (AP). O FL catalisa a lise dos macrófagos através da clivagem da proteína quinase. O FE é uma ciclase que inibe a fagocitose mediada pelos macrófagos e induz a disfunção dos neutrófilos e edema local, enquanto, AP estimula a ligação de FL e FE ao recetor da toxina antrax na superfície das células dos mamíferos e, conseqüentemente, exercem efeito citotóxico. Desta forma, o AP ao ser neutralizado permite evitar os efeitos patogénicos da toxina (288). O raxibacumab é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G1 humana que neutraliza AP e impede a entrada de EF e LF para o interior das células e, deste modo, previne a citotoxicidade mediada pela toxina (288).

O obiltoxaximab é um mAb de imunoglobulina G1 quimérico que neutraliza AP. Este fármaco demonstrou um perfil de segurança e de tolerabilidade favoráveis após administração intravenosa e intramuscular (297). Adicionalmente, o obiltoxaximab demonstrou alguns benefícios em comparação com a terapêutica com antibióticos e não afetou a função imune normal. Globalmente, este mAb demonstrou vantagens terapêuticas nas fases iniciais e tardias após a inalação de antrax, onde promove a sobrevivência do doente, inibe a disseminação bacteriana e diminui a toxemia (288,297).

A bactéria *C. difficile* produz as toxinas TcdA e TcdB que levam à disfunção da barreira epitelial intestinal e causam a apoptose celular. A molécula de bezlotoxumab, através das suas regiões Fab, liga-se aos dois epítomos de TcdB e bloqueia parcialmente a ligação da toxina à célula hospedeira. Deste modo, este mAb pode prevenir através da neutralização da toxina os danos no epitélio intestinal e colite, facilitar a reconstituição da microbiota intestinal e reduzir o risco das recidivas da infeção por esta bactéria (288,298–300). Este fármaco apresenta um perfil favorável de tolerabilidade e com baixa imunogenicidade, no entanto, os elevados custos limitam a sua utilização (288,301).

Atualmente, estão em desenvolvimento uma diversidade de anticorpos monoclonais antibacterianos, particularmente, contra as bactérias *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (288,302).

No tratamento da infeção pela bactéria *A. baumannii* foi testada a aplicação do anticorpo monoclonal 65 (MAb 65) que se liga à porção de hidrato de carbono na superfície da bactéria, em combinação com o antibiótico colistina e individualmente (302). A administração concomitante do MAb 65 com a colistina demonstrou uma terapêutica eficaz, sinérgica levando à proteção completa contra a bacteriemia mortal por *A. baumannii* (302). A administração de 100 mg de MAb 65 por via intravenosa demonstrou uma ação protetora contra a pneumonia por aspiração e demonstrou uma capacidade de eliminação quase total das bactérias nos pulmões e sangue, 48 horas após a infeção (302). Foi ainda reportada que a administração individual de MAb 65 conduziu a uma redução da carga bacteriana e preveniu o início de septicemia, bem como teve uma ação protetora contra a pneumonia mortal provocada pela bactéria *A. baumannii* (302).

A toxina  $\alpha$ -hemolisina produzida pela bactéria *S. aureus* é um fator de virulência importante que tem a capacidade de se ligar ao recetor das metaloproteases na superfície

celular do hospedeiro (288). A interação entre estas moléculas pode levar a alterações na conformação da proteína e polimerização que leva à formação de poros, seguida pela degradação da membrana plasmática, lise celular e danos tecidulares (288). Esta toxina contribui para a invasão bacteriana do sistema imune, medeia a lise subcelular e perturba as *tigh junctions* entre as células endoteliais e as células epiteliais (288). O mAB Suvratoxumab (MEDI4893) que se liga aos epítomos da toxina  $\alpha$ -hemolisina bloqueia a sua associação ao recetor e impede a oligomerização (288). Um estudo de fase 2 duplo-cego de MEDI4893 reportou a diminuição da incidência de pneumonia causada pela bactéria *S. aureus* e um perfil de segurança positivo em doentes em ventilação mecânica e colonizados por esta bactéria (303).

A bactéria *P. aeruginosa* tem como um dos principais fatores de virulência a proteína de transporte do sistema 3 (T3SS), que tem com função injetar toxinas diretamente nas células do hospedeiro. Por outro lado, este fator contribui para a citotoxicidade das células epiteliais, macrófagos e neutrófilos e, também, apresenta um papel importante na patogenicidade desta bactéria, visto que, está associado a características de resistência aos antibióticos (288,295,304). O fator T3SS apresenta na sua ligação a proteína PcrV que é importante para o transporte de exotoxinas para o interior das células do hospedeiro (288). Foi demonstrado que pequenas moléculas que se ligam a PcrV podem proteger os macrófagos das toxinas da bactéria *P. aeruginosa* (288,294). Desta forma, a proteína PcrV pode ser um alvo terapêutico para o tratamento de infeções causadas por esta bactéria. O anticorpo monoclonal KB001 é um fragmento Fab que se liga e inibe a proteína PcrV. A administração de KB001 num modelo de danos pulmonares devido à infeção crónica e aguda pela bactéria *P. aeruginosa* levou a uma diminuição na concentração do marcador inflamatório interleucina-8 na expetoração (288,295).

Pelo exposto podemos inferir que os anticorpos monoclonais podem ter um papel importante no tratamento de infeções bacterianas resistentes aos antibióticos, quer em terapêutica individual ou em combinação com outros fármacos, contudo é necessário a condução de um maior número de estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos patogénicos das bactérias para o desenvolvimento de mAbs adequados (288).

## 7. Conclusão

Os antibióticos são agentes terapêuticos de grande importância e utilidade na saúde pública, permitindo tratar infecções bacterianas e controlar a sua disseminação. No entanto, a resistência aos antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde global e em constante crescimento, visto que, existem cada vez mais espécies bacterianas a desenvolverem mecanismos de resistência, até mesmo para agentes antibacterianos de última linha. De acordo com o exposta na presente revisão bibliográfica e noutras revisões, a resistência aos antibióticos é um fenómeno complexo, que pode ter diversas causas e pode ser influenciado por múltiplos fatores, nomeadamente, a transferência horizontal de genes e mutações genéticas nas bactérias. Este fenómeno de resistência apresenta consequências e graves problemas para a realização de determinados procedimentos médicos, para a manutenção saudável da microbiota intestinal humana e para o funcionamento apropriado das mitocôndrias. Foi ainda observado o impacto do uso inadequado destes fármacos nas áreas da pecuária, aquacultura e no meio ambiente. Esta realidade faz com seja necessário a implementação de medidas para reduzir o impacto da resistência aos antibióticos, evitar a sua disseminação, sensibilizar a comunidade para a problemática do uso inadequado dos antibióticos e as suas consequências e, igualmente, desenvolver possíveis alternativas ou adjuvantes à terapêutica com antibióticos.

A implementação de estratégias e métodos para impedir a disseminação da resistência aos antibióticos é também uma vertente importante para se considerar. Verificou-se a importância das estratégias para mitigar o impacto dos antibióticos no meio ambiente, como a introdução de técnicas de eliminação destes fármacos nos sistemas de tratamento de efluentes, nomeadamente, o tratamento por zonas húmidas, tratamento por processos de oxidação avançados e tratamento por microalgas.

É fundamental salientar a necessidade de cooperação entre os diferentes membros da sociedade e a implementação de boas práticas de utilização de antibióticos, para colmatar os riscos associados às bactérias resistentes. Os profissionais de saúde, como os médicos e farmacêuticos, devem ter um papel ativo na execução de programas de *Antimicrobial Stewardship*, em conjunto com os veterinários, produtores pecuários e a comunidade em geral.

Por fim, é necessário explorar e colocar em prática as possíveis alternativas aos antibióticos. Foi analisada a existência de diversas opções para substituir ou complementar a terapêutica antibacteriana, nomeadamente, a utilização de probióticos e prebióticos para salvaguardar a microbiota intestinal humana, a utilização de bacteriocinas, vacinas, extratos de plantas e anticorpos monoclonais. Estas estratégias e potencial ação são fundamentais para evitar o desenvolvimento das resistências aos antibióticos e assegurar a eficácia dos antibióticos existentes.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF. Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Commun* [Internet]. 2015;30(3):309–14. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10410236.2014.943634>
2. Serwecińska L. Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: A risk to the environment and to public health. *Water (Switzerland)*. 2020;12(12).
3. World Health Organization. Antibiotic resistance [Internet]. 2020 [citado 14 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
4. Lee Ventola C. The Antibiotic Resistance Crisis. *Compr Biochem*. 2015;11(4):181–224.
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629–55.
6. Neill JO'. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. 2014.
7. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - J Med Soc*. 2018;32(1):76–7.
8. Kraemer SA, Ramachandran A, Perron GG. Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy. *Microorganisms*. 2019;7(6):1–24.
9. The antibiotic alarm. *Nature* [Internet]. 12 de Março de 2013;495(7440):141–141. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/495141a>
10. Woolhouse M, Ward M, Van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370(1670).
11. Turolla A, Cattaneo M, Marazzi F, Mezzanotte V, Antonelli M. Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere* [Internet]. 2018;191:761–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.099>
12. Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3903–10.
13. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* [Internet]. 2017;33(3):300. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672523/>
14. Pontes DS, de Araujo RSA, Dantas N, Scotti L, Scotti MT, de Moura RO, et al. Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(1):42–74.
15. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms,

- Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* [Internet]. 2020;88(1):26–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
16. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(5):1060–75.
  17. Abushaheen MA, Muzaaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*. 2020;66(6).
  18. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;95:32–42. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
  19. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics* [Internet]. 12 de Março de 2020;9(3):119. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/3/119>
  20. Aumeran C, Balestrino D, Forestier C. Bacterial biofilms and health [Internet]. *Encyclopedia of the Environment*. 2022 [citado 10 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.encyclopedie-environnement.org/en/health/bacterial-biofilms/>
  21. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(10):571–86. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>
  22. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(9):563–75. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
  23. Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 16 de Dezembro de 2019;8(1):76. Disponível em: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-019-0533-3>
  24. van Duin D, Paterson DL. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2016;30(2):377–90. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
  25. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
  26. Jevons MP. “Celbenin” -resistant *Staphylococci*. *Br Med J*. 1961;1(5219):124–5.
  27. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *mec* DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. Junho de 1999;43(6):1449–58. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.43.6.1449>
  28. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(May):1–23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>

29. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* [Internet]. 1 de Julho de 2014;124(7):2836–40. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/68834>
30. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med* [Internet]. 20 de Agosto de 1998;339(8):520–32. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199808203390806>
31. Haessler S, Mackenzie T, Kirkland KB. Long-term outcomes following infection with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* [Internet]. Maio de 2008;69(1):39–45. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670108000285>
32. Yaw LK, Robinson JO, Ho KM. A comparison of long-term outcomes after methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Outubro de 2014;14(10):967–75. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991470876X>
33. Feuerstadt P. *Clostridium difficile* Infection. *Clin Transl Gastroenterol* [Internet]. Junho de 2015;6(6):e92. Disponível em: <https://journals.lww.com/01720094-201506000-00005>
34. Centers for Disease Control and Prevention. What is C. diff? [Internet]. 2021 [citado 28 de Junho de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cdiff/what-is.html>
35. Saha S, Kapoor S, Tariq R, Schuetz AN, Tosh PK, Pardi DS, et al. Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe* [Internet]. Agosto de 2019;58:35–46. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102072>
36. O’Grady K, Knight DR, Riley T V. Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2021;40(12):2459–78. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5>
37. World Health Organization. Antimicrobial Resistance [Internet]. 2021 [citado 17 de Abril de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
38. Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 17 de Março de 2021;34(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00174-20>
39. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1057–98.
40. de Godoy JMP, Ribeiro J V., Caracanhas LA, Godoy MDFG. Hospital infection after major amputations. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9:15–7.
41. Sadat U, Chaudhuri A, Hayes PD, Gaunt ME, Boyle JR, Varty K. Five Day Antibiotic Prophylaxis for Major Lower Limb Amputation Reduces Wound Infection Rates and the Length of In-hospital Stay. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;35(1):75–8.

42. Smith R, Coast J. The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*. 2013;346(7899):1–5.
43. Mikulska M, Del Bono V, Raiola AM, Bruno B, Gualandi F, Occhini D, et al. Blood Stream Infections in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Reemergence of Gram-Negative Rods and Increasing Antibiotic Resistance. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2009;15(1):47–53. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.10.024>
44. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* (80- ) [Internet]. 29 de Abril de 2016;352(6285):544–5. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad9378>
45. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S, Bilinski J, Caselli E, Comelli EM, et al. Microbiota medicine: towards clinical revolution. *J Transl Med* [Internet]. 2022;20(1):1–21. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03296-9>
46. Schwartz DJ, Langdon AE, Dantas G. Understanding the impact of antibiotic perturbation on the human microbiome. *Genome Med*. 2020;12(1):1–12.
47. Patangia D V., Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen*. 2022;11(1):1–23.
48. Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis*. 2016;34(3):260–8.
49. Flint HJ. Obesity and the Gut Microbiota. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. Novembro de 2011;45(S):S128–32. Disponível em: <https://journals.lww.com/00004836-201111001-00008>
50. Serino M, Fernández-Real JM, Fuentes EG, Queipo-Ortuño M, Moreno-Navarrete JM, Sánchez Á, et al. The gut microbiota profile is associated with insulin action in humans. *Acta Diabetol*. 2013;50(5):753–61.
51. Cani PD. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Julho de 2012;18(SUPPL. 4):50–3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03866.x>
52. Senn V, Bassler D, Choudhury R, Scholkmann F, Righini-Grunder F, Vuille-dit-Bile RN, et al. Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood—A Comprehensive Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(October):1–12.
53. Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes* [Internet]. 2014;38(10):1290–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2014.119>
54. Suárez-Rivero JM, Pastor-Maldonado CJ, Povea-Cabello S, Álvarez-Córdoba M, Villalón-García I, Talaverón-Rey M, et al. Mitochondria and antibiotics: For good or for evil? *Biomolecules*. 2021;11(7).
55. Patel SJ, Wellington M, Shah RM, Ferreira MJ. Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. *Clin Ther* [Internet].

- 2020;42(9):1649–58. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.004>
56. Sazykin IS, Khmelevtsova LE, Seliverstova EY, Sazykina MA. Effect of Antibiotics Used in Animal Husbandry on the Distribution of Bacterial Drug Resistance (Review). *Appl Biochem Microbiol*. 2021;57(1):20–30.
  57. Liyanage GY, Pathmalal M. Risk of prophylactic antibiotics in livestock and poultry farms; a growing problem for human and animal health. *Pharm J Sri Lanka*. 2017;7(0):13.
  58. Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Heal*. 2017;1(8):e316–27.
  59. Low CX, Tan LTH, Mutalib NSA, Pusparajah P, Goh BH, Chan KG, et al. Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review. *Antibiotics*. 2021;10(5):1–17.
  60. Bengtsson B, Greko C. Antibiotic resistance-consequences for animal health, welfare, and food production. *Ups J Med Sci*. 2014;119(2):96–102.
  61. Salama NA, Abou-Raya SH, Shalaby AR, Emam WH, Mehaya FM. Incidence of tetracycline residues in chicken meat and liver retailed to consumers. *Food Addit Contam Part B [Internet]*. Junho de 2011;4(2):88–93. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19393210.2011.585245>
  62. Mensah SEP, Koudandé OD, Sanders P, Laurentie M, Mensah GA, Abiola FA. Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: Public health risks. *OIE Rev Sci Tech*. 2014;33(3):975–86.
  63. Van TTH, Yidana Z, Smooker PM, Coloe PJ. Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses. *J Glob Antimicrob Resist [Internet]*. 2020;20:170–7. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.031>
  64. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere [Internet]*. Outubro de 2006;65(5):725–59. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653506003213>
  65. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clin Infect Dis [Internet]*. 15 de Maio de 2013;56(10):1445–50. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cit070>
  66. Iwu CD, Korsten L, Okoh AI. The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: A concern for public health. *Microbiologyopen*. 2020;9(9):1–28.
  67. Manage PM. Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. *Sri Lanka J Aquat Sci*. 2018;23(1):13.
  68. Sun R, Chen J, Pan C, Sun Y, Mai B, Li QX. Antibiotics and food safety in aquaculture. *J Agric Food Chem*. 2020;68(43):11908–19.

69. Polianciuc SI, Gurzău AE, Kiss B, Georgia Ștefan M, Loghin F. Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Med Pharm Reports*. 2020;93(3):231–40.
70. Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environ Res [Internet]*. 2019;169(November 2018):483–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
71. Cycoń M, Mroziak A, Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front Microbiol*. 2019;10(MAR).
72. Wang X, Ryu D, Houtkooper RH, Auwerx J. Antibiotic use and abuse: A threat to mitochondria and chloroplasts with impact on research, health, and environment. *BioEssays*. 2015;37(10):1045–53.
73. Liu F, Ying GG, Tao R, Zhao JL, Yang JF, Zhao LF. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ Pollut [Internet]*. 2009;157(5):1636–42. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.021>
74. Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(5):257–69.
75. Danner MC, Robertson A, Behrends V, Reiss J. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Sci Total Environ [Internet]*. 2019;664:793–804. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>
76. Kumar A, Pal D. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *J Environ Chem Eng [Internet]*. 2018;6(1):52–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.059>
77. WHO. Technical Brief on Water, Sanitation, Hygiene and Wastewater Management to Prevent Infections and Reduce the Spread of Antimicrobial Resistance [Internet]. 2020. 1–32 p. Disponível em: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/wash-wastewater-management-to-prevent-infections-and-reduce-amr/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/wash-wastewater-management-to-prevent-infections-and-reduce-amr/en/)
78. Bairán G, Rebollar-Pérez G, Chávez-Bravo E, Torres E. Treatment processes for microbial resistance mitigation: The technological contribution to tackle the problem of antibiotic resistance. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(23):1–20.
79. Phoon BL, Ong CC, Mohamed Saheed MS, Show PL, Chang JS, Ling TC, et al. Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *J Hazard Mater [Internet]*. 2020;400(April):122961. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122961>
80. Graham DW, Giesen MJ, Bunce JT. Strategic approach for prioritising local and regional sanitation interventions for reducing global antibiotic resistance. *Water (Switzerland)*. 2018;11(1).
81. Bürgmann H, Frigon D, Gaze WH, Manaia CM, Pruden A, Singer AC, et al. Water and sanitation: An essential battlefield in the war on antimicrobial resistance. *FEMS*

- Microbiol Ecol. 2018;94(9):1–14.
82. Barancheshme F, Munir M. Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. *Front Microbiol.* 2018;8(JAN).
  83. Du J, Geng J, Ren H, Ding L, Xu K, Zhang Y. Variation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plant with A2O-MBR system. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 30 de Março de 2015;22(5):3715–26. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3552-x>
  84. Aydin S, Ince B, Ince O. Assessment of anaerobic bacterial diversity and its effects on anaerobic system stability and the occurrence of antibiotic resistance genes. *Bioresour Technol* [Internet]. Maio de 2016;207:332–8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416300566>
  85. Uluseker C, Kaster KM, Thorsen K, Basiry D, Shobana S, Jain M, et al. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Front Microbiol.* 2021;12(October).
  86. Wang S, Ma X, Liu Y, Yi X, Du G, Li J. Fate of antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and cell-free antibiotic-resistant genes in full-scale membrane bioreactor wastewater treatment plants. *Bioresour Technol* [Internet]. Abril de 2020;302:122825. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852420300948>
  87. Christgen B, Yang Y, Ahammad SZ, Li B, Rodriguez DC, Zhang T, et al. Metagenomics Shows That Low-Energy Anaerobic–Aerobic Treatment Reactors Reduce Antibiotic Resistance Gene Levels from Domestic Wastewater. *Environ Sci Technol* [Internet]. 17 de Fevereiro de 2015;49(4):2577–84. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es505521w>
  88. Ma Y, Wilson CA, Novak JT, Riffat R, Aynur S, Murthy S, et al. Effect of Various Sludge Digestion Conditions on Sulfonamide, Macrolide, and Tetracycline Resistance Genes and Class I Integrons. *Environ Sci Technol* [Internet]. 15 de Setembro de 2011;45(18):7855–61. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es200827t>
  89. Ghosh S, Ramsden SJ, LaPara TM. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 14 de Setembro de 2009;84(4):791–6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2125-2>
  90. Tian Z, Zhang Y, Yu B, Yang M. Changes of resistome, mobilome and potential hosts of antibiotic resistance genes during the transformation of anaerobic digestion from mesophilic to thermophilic. *Water Res* [Internet]. Julho de 2016;98:261–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416302226>
  91. Diehl DL, LaPara TM. Effect of Temperature on the Fate of Genes Encoding Tetracycline Resistance and the Integrase of Class 1 Integrons within Anaerobic and Aerobic Digesters Treating Municipal Wastewater Solids. *Environ Sci Technol* [Internet]. 1 de Dezembro de 2010;44(23):9128–33. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es102765a>

92. Kumar S, Dutta V. Constructed wetland microcosms as sustainable technology for domestic wastewater treatment: an overview. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;
93. He Y, Zhang L, Jiang L, Wagner T, Sutton NB, Ji R, et al. Improving removal of antibiotics in constructed wetland treatment systems based on key design and operational parameters: A review. *J Hazard Mater [Internet]*. 2021;407(August 2020):124386. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124386>
94. Christofilopoulos S, Kaliakatsos A, Triantafyllou K, Gounaki I, Venieri D, Kalogerakis N. Evaluation of a constructed wetland for wastewater treatment: Addressing emerging organic contaminants and antibiotic resistant bacteria. *N Biotechnol*. 2019;52(May):94–103.
95. Katakai S, Chatterjee S, Vairale MG, Dwivedi SK, Gupta DK. Constructed wetland, an eco-technology for wastewater treatment: A review on types of wastewater treated and components of the technology (macrophyte, biofilm and substrate). *J Environ Manage [Internet]*. 2021;283(December 2020):111986. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.111986>
96. GUAN Y, WANG B, GAO Y, LIU W, ZHAO X, HUANG X, et al. Occurrence and Fate of Antibiotics in the Aqueous Environment and Their Removal by Constructed Wetlands in China: A review. *Pedosphere [Internet]*. 2017;27(1):42–51. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60295-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60295-9)
97. Matamoros V, Rodríguez Y, Bayona JM. Mitigation of emerging contaminants by full-scale horizontal flow constructed wetlands fed with secondary treated wastewater. *Ecol Eng [Internet]*. Fevereiro de 2017;99:222–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925857416306772>
98. Ohore OE, Qin Z, Sanganyado E, Wang Y, Jiao X, Liu W, et al. Ecological impact of antibiotics on bioremediation performance of constructed wetlands: Microbial and plant dynamics, and potential antibiotic resistance genes hotspots. *J Hazard Mater [Internet]*. 2022;424(PB):127495. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127495>
99. Xu J, Liu X, Lv Y, Guo X, Lu S. Response of *Cyperus involucreatus* to sulfamethoxazole and ofloxacin-contaminated environments: Growth physiology, transportation, and microbial community. *Ecotoxicol Environ Saf [Internet]*. Dezembro de 2020;206:111332. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651320311696>
100. Tong X, Wang X, He X, Wang Z, Li W. Effects of antibiotics on microbial community structure and microbial functions in constructed wetlands treated with artificial root exudates. *Environ Sci Process Impacts [Internet]*. 2020;22(1):217–26. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9EM00458K>
101. Wang J, Zhuan R, Chu L. The occurrence, distribution and degradation of antibiotics by ionizing radiation: An overview. *Sci Total Environ [Internet]*. 2019;646:1385–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.415>
102. Zhang S, Lu Y-X, Zhang J-J, Liu S, Song H-L, Yang X-L. Constructed Wetland Revealed Efficient Sulfamethoxazole Removal but Enhanced the Spread of Antibiotic Resistance

- Genes. *Molecules* [Internet]. 14 de Fevereiro de 2020;25(4):834. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/834>
103. Liu X, Guo X, Liu Y, Lu S, Xi B, Zhang J, et al. A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. *Environ Pollut* [Internet]. Novembro de 2019;254:112996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749119319177>
  104. Wen H, Zhu H, Xu Y, Yan B, Shutes B, Bañuelos G, et al. Removal of sulfamethoxazole and tetracycline in constructed wetlands integrated with microbial fuel cells influenced by influent and operational conditions. *Environ Pollut* [Internet]. Março de 2021;272:115988. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026974912036677X>
  105. Wang J, Zhuan R. Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;701:135023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135023>
  106. Wang N, Zheng T, Zhang G, Wang P. A review on Fenton-like processes for organic wastewater treatment. *J Environ Chem Eng* [Internet]. Março de 2017;4(1):762–87. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894718317790>
  107. Elmolla E, Chaudhuri M. Optimization of Fenton process for treatment of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution. *J Hazard Mater* [Internet]. 30 de Outubro de 2009;170(2–3):666–72. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389409007559>
  108. Oh J, Medriano CA, Kim S. The effect of tetracycline in the antibiotic resistance gene transfer before and after ozone disinfection. *Desalin Water Treat* [Internet]. 8 de Janeiro de 2016;57(2):646–50. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19443994.2014.986828>
  109. Iakovides IC, Michael-Kordatou I, Moreira NFF, Ribeiro AR, Fernandes T, Pereira MFR, et al. Continuous ozonation of urban wastewater: Removal of antibiotics, antibiotic-resistant *Escherichia coli* and antibiotic resistance genes and phytotoxicity. *Water Res* [Internet]. Agosto de 2019;159:333–47. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135419304117>
  110. WANG JL, XU LJ. Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Formation of Hydroxyl Radical and Application. *Crit Rev Environ Sci Technol* [Internet]. Fevereiro de 2012;42(3):251–325. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2010.507698>
  111. Jung YJ, Kim WG, Yoon Y, Hwang T-M, Kang J-W. pH Effect on Ozonation of Ampicillin: Kinetic Study and Toxicity Assessment. *Ozone Sci Eng* [Internet]. Maio de 2012;34(3):156–62. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01919512.2012.662890>
  112. Sandikly N, Kassir M, El Jamal M, Takache H, Arnoux P, Mokh S, et al. Comparison of the toxicity of waters containing initially sulfaquinoxaline after photocatalytic treatment by TiO<sub>2</sub> and polyaniline/TiO<sub>2</sub>. *Environ Technol* [Internet]. 28 de Janeiro de 2021;42(3):419–28. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09593330.2019.1630485>

113. Espíndola JC, Cristóvão RO, Santos SGS, Boaventura RAR, Dias MM, Lopes JCB, et al. Intensification of heterogeneous TiO<sub>2</sub> photocatalysis using the NETmix milli-photoreactor under microscale illumination for oxytetracycline oxidation. *Sci Total Environ* [Internet]. Setembro de 2019;681:467–74. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719320789>
114. Dimitrakopoulou D, Rethemiotaki I, Frontistis Z, Xekoukoulotakis NP, Venieri D, Mantzavinos D. Degradation, mineralization and antibiotic inactivation of amoxicillin by UV-A/TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *J Environ Manage* [Internet]. Maio de 2012;98:168–74. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301479712000114>
115. León DE, Zúñiga-Benítez H, Peñuela GA, Mansilla HD. Photocatalytic Removal of the Antibiotic Cefotaxime on TiO<sub>2</sub> and ZnO Suspensions Under Simulated Sunlight Radiation. *Water, Air, Soil Pollut* [Internet]. 2 de Setembro de 2017;228(9):361. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11270-017-3557-4>
116. Ahmadi M, Ramezani Motlagh H, Jaafarzadeh N, Mostoufi A, Saeedi R, Barzegar G, et al. Enhanced photocatalytic degradation of tetracycline and real pharmaceutical wastewater using MWCNT/TiO<sub>2</sub> nano-composite. *J Environ Manage* [Internet]. Janeiro de 2017;186:55–63. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030147971630768X>
117. Zhu Z, Huo P, Lu Z, Yan Y, Liu Z, Shi W, et al. Fabrication of magnetically recoverable photocatalysts using g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> for effective separation of charge carriers through like-Z-scheme mechanism with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mediator. *Chem Eng J* [Internet]. Janeiro de 2018;331:615–25. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138589471731481X>
118. Kitazono Y, Ihara I, Toyoda K, Umetsu K. Antibiotic removal from waste milk by electrochemical process: degradation characteristics in concentrated organic solution. *J Mater Cycles Waste Manag* [Internet]. 2 de Julho de 2017;19(3):1261–9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10163-016-0517-9>
119. Haidar M, Dirany A, Sirés I, Oturan N, Oturan MA. Electrochemical degradation of the antibiotic sulfachloropyridazine by hydroxyl radicals generated at a BDD anode. *Chemosphere* [Internet]. Maio de 2013;91(9):1304–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513003664>
120. Moreira FC, Boaventura RAR, Brillas E, Vilar VJP. Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their application to synthetic and real wastewaters. *Appl Catal B Environ* [Internet]. Março de 2017;202:217–61. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926337316306440>
121. Rivas-Ortiz IB, Cruz-González G, Lastre-Acosta AM, Manduca-Artiles M, Rapado-Paneque M, Chávez-Ardanza A, et al. Optimization of radiolytic degradation of sulfadiazine by combining Fenton and gamma irradiation processes. *J Radioanal Nucl Chem* [Internet]. 10 de Dezembro de 2017;314(3):2597–607. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10967-017-5629-8>
122. Wang J, Guo Z, Shen X, Guo Q, Zhao Y, Zhu S, et al. Gamma irradiation-induced

- decomposition of sulfamethoxazole in aqueous solution: the influence of additives, biological inhibitory, and degradation mechanisms. *Environ Sci Pollut Res [Internet]*. 31 de Outubro de 2017;24(30):23658–65. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-0006-2>
123. Sayed M, Khan JA, Shah LA, Shah NS, Khan HM, Rehman F, et al. Degradation of quinolone antibiotic, norfloxacin, in aqueous solution using gamma-ray irradiation. *Environ Sci Pollut Res [Internet]*. 28 de Julho de 2016;23(13):13155–68. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-6475-x>
124. Zhuan R, Wang J. Degradation of sulfamethoxazole by ionizing radiation: Kinetics and implications of additives. *Sci Total Environ [Internet]*. Junho de 2019;668:67–73. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719310034>
125. Guo Z, Zhu S, Zhao Y, Cao H, Liu F. Radiolytic decomposition of ciprofloxacin using  $\gamma$  irradiation in aqueous solution. *Environ Sci Pollut Res [Internet]*. 3 de Outubro de 2015;22(20):15772–80. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4715-0>
126. Chen X, Wang J. Degradation of antibiotic Cephalosporin C in different water matrices by ionizing radiation: Degradation kinetics, pathways, and toxicity. *Sci Total Environ [Internet]*. Outubro de 2021;791:148253. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721033246>
127. Akbari MZ, Xu Y, Lu Z, Peng L. Review of antibiotics treatment by advance oxidation processes. *Environ Adv [Internet]*. 2021;5:100111. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100111>
128. Leng L, Wei L, Xiong Q, Xu S, Li W, Lv S, et al. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. *Chemosphere [Internet]*. 2020;238:124680. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124680>
129. Xiong Q, Hu LX, Liu YS, Zhao JL, He LY, Ying GG. Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. *Environ Int [Internet]*. 2021;155:106594. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106594>
130. Villar-Navarro E, Baena-Nogueras RM, Paniw M, Perales JA, Lara-Martín PA. Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: High rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. *Water Res [Internet]*. Agosto de 2018;139:19–29. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135418302689>
131. Sutherland DL, Ralph PJ. Microalgal bioremediation of emerging contaminants - Opportunities and challenges. *Water Res [Internet]*. Novembro de 2019;164:114921. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135419306955>
132. Daneshvar E, Zarrinmehr MJ, Hashtjin AM, Farhadian O, Bhatnagar A. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. *Bioresour Technol [Internet]*. Novembro de 2018;268:523–30. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241831126X>

133. Hena S, Gutierrez L, Croué J-P. Removal of metronidazole from aqueous media by *C. vulgaris*. *J Hazard Mater* [Internet]. Fevereiro de 2020;384:121400. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389419313548>
134. Yu Y, Zhou Y, Wang Z, Torres OL, Guo R, Chen J. Investigation of the removal mechanism of antibiotic ceftazidime by green algae and subsequent microbic impact assessment. *Sci Rep* [Internet]. 23 de Dezembro de 2017;7(1):4168. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04128-3>
135. Xiong J-Q, Kurade MB, Jeon B-H. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. *Chem Eng J* [Internet]. Abril de 2017;313:1251–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894716315790>
136. Sun M, Lin H, Guo W, Zhao F, Li J. Bioaccumulation and biodegradation of sulfamethazine in *Chlorella pyrenoidosa*. *J Ocean Univ China* [Internet]. 8 de Dezembro de 2017;16(6):1167–74. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11802-017-3367-8>
137. Wang S, Poon K, Cai Z. Removal and metabolism of triclosan by three different microalgal species in aquatic environment. *J Hazard Mater* [Internet]. Janeiro de 2018;342:643–50. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389417306854>
138. Xie P, Chen C, Zhang C, Su G, Ren N, Ho S-H. Revealing the role of adsorption in ciprofloxacin and sulfadiazine elimination routes in microalgae. *Water Res* [Internet]. Abril de 2020;172:115475. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135420300117>
139. Xiong Q, Liu Y-S, Hu L-X, Shi Z-Q, Cai W-W, He L-Y, et al. Co-metabolism of sulfamethoxazole by a freshwater microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Res* [Internet]. Maio de 2020;175:115656. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135420301925>
140. Xiong J-Q, Kurade MB, Patil D V., Jang M, Paeng K-J, Jeon B-H. Biodegradation and metabolic fate of levofloxacin via a freshwater green alga, *Scenedesmus obliquus* in synthetic saline wastewater. *Algal Res* [Internet]. Julho de 2017;25:54–61. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416308414>
141. Xiong J-Q, Kim S-J, Kurade MB, Govindwar S, Abou-Shanab RAI, Kim J-R, et al. Combined effects of sulfamethazine and sulfamethoxazole on a freshwater microalga, *Scenedesmus obliquus*: toxicity, biodegradation, and metabolic fate. *J Hazard Mater* [Internet]. Maio de 2019;370:138–46. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438941830579X>
142. Nguyen HT, Yoon Y, Ngo HH, Jang A. The application of microalgae in removing organic micropollutants in wastewater. *Crit Rev Environ Sci Technol* [Internet]. 18 de Junho de 2021;51(12):1187–220. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643389.2020.1753633>

143. Hom-Diaz A, Norvill ZN, Blánquez P, Vicent T, Guieysse B. Ciprofloxacin removal during secondary domestic wastewater treatment in high rate algal ponds. *Chemosphere* [Internet]. Agosto de 2017;180:33–41. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565351730509X>
144. Yang K, Lu J, Jiang W, Jiang C, Chen J, Wang Z, et al. An integrated view of the intimate coupling UV irradiation and algal treatment on antibiotic: Compatibility, efficiency and microbic impact assessment. *J Environ Chem Eng* [Internet]. Outubro de 2017;5(5):4262–8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343717304128>
145. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017;23(11):793–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.08.026>
146. INFARMED IP. Medicamentos anti-infecciosos [Internet]. 2017 [citado 16 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://app10.infarmed.pt/prontuario/frameprimeiracapitulos.html>
147. Centers for Disease Control and Prevention. Core Elements of Hospital Antibiotic Stewardship Programs [Internet]. 2019 [citado 14 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/core-elements/hospital.html>
148. de With K, Allerberger F, Amann S, Apfalter P, Brodt HR, Eckmanns T, et al. Strategies to enhance rational use of antibiotics in hospital: a guideline by the German Society for Infectious Diseases. *Infection*. 2017;44(3):395–439.
149. Florek HJ. Principles of antibiotic prophylaxis in vascular surgery. *Chirurg*. 2017;68(9):955–8.
150. Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, 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. *Clin Infect Dis*. 2017;44(2):159–77.
151. Septimus EJ. Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. *Med Clin North Am* [Internet]. 2018;102(5):819–29. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.04.005>
152. Suzuki HG, Dewez JE, Nijman RG, Yeung S. Clinical practice guidelines for acute otitis media in children: a systematic review and appraisal of European national guidelines. *BMJ Open* [Internet]. 5 de Maio de 2020;10(5):e035343. Disponível em: <https://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2019-035343>
153. Piltcher OB, Kosugi EM, Sakano E, Mion O, Testa JRG, Romano FR, et al. How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. Maio de 2018;84(3):265–79. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1808869418300260>
154. CDC, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). The Core Elements of Outpatient Antibiotic

- Stewardship: Clinician Checklist. 2017;2. Disponível em: [https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/pdfs/16\\_268900-A\\_CoreElementsOutpatient\\_check\\_1\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/pdfs/16_268900-A_CoreElementsOutpatient_check_1_508.pdf)
155. Garau J, Bassetti M. Role of pharmacists in antimicrobial stewardship programmes. *Int J Clin Pharm* [Internet]. 2018;40(5):948–52. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11096-018-0675-z>
  156. Essack S, Bell J, Shephard A. Community pharmacists—Leaders for antibiotic stewardship in respiratory tract infection. *J Clin Pharm Ther*. 2018;43(2):302–7.
  157. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2017;57(13):2857–76. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
  158. World Health Organization. Antibiotic resistance [Internet]. 2020 [citado 15 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
  159. Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças. Key messages for the general public: Self-medication with antibiotics [Internet]. European Antibiotic Awareness Day. 2017 [citado 15 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://antibiotic.ecdc.europa.eu/en/get-informed/key-messages/general-public-self-medication-antibiotics>
  160. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Prescribing and Use [Internet]. 2021 [citado 21 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/index.html>
  161. World Organisation for Animal Health. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine [Internet]. Terrestrial Animal Health Code. 2022 [citado 20 de Setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>
  162. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Code of Practice to Minimize and Contain Foodborne Antimicrobial Resistance. 2021;
  163. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 10 de Agosto de 2014;11(8):506–14. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
  164. Daniali M, Nikfar S, Abdollahi M. Antibiotic resistance propagation through probiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2020;16(12):1207–15. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1825682>
  165. Elshaghabee FMF, Rokana N. Mitigation of antibiotic resistance using probiotics, prebiotics and synbiotics. A review. *Environ Chem Lett* [Internet]. 2022;20(2):1295–308. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01382-w>

166. Li T, Teng D, Mao R, Hao Y, Wang X, Wang J. A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Food Res Int* [Internet]. 2020;136(February):109571. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109571>
167. Yang H, Sun Y, Cai R, Chen Y, Gu B. The impact of dietary fiber and probiotics in infectious diseases. *Microb Pathog* [Internet]. 2020;140(December 2019):103931. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103931>
168. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*. 2020;25(12):1–22.
169. Li X, Wang Q, Hu X, Liu W. Current Status of Probiotics as Supplements in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(March):1–12.
170. Mills JP, Rao K, Young VB. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. Janeiro de 2018;34(1):3–10. Disponível em: <https://journals.lww.com/00001574-201801000-00003>
171. Esaiassen E, Hjerde E, Cavanagh JP, Pedersen T, Andresen JH, Rettedal SI, et al. Effects of Probiotic Supplementation on the Gut Microbiota and Antibiotic Resistome Development in Preterm Infants. *Front Pediatr* [Internet]. 16 de Novembro de 2018;6. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2018.00347/full>
172. Newman AM, Arshad M. The Role of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Combating Multidrug-Resistant Organisms. *Clin Ther* [Internet]. Setembro de 2020;42(9):1637–48. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291820303210>
173. Buyukeren M, Yigit S, Buyukcam A, Kara A, Celik HT, Yurdakok M. A new use of *Lactobacillus rhamnosus* GG administration in the NICU: colonized vancomycin-resistant enterococcus eradication in the gastrointestinal system. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 19 de Março de 2022;35(6):1192–8. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14767058.2020.1743671>
174. Eggers S, Barker AK, Valentine S, Hess T, Duster M, Safdar N. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on carriage of *Staphylococcus aureus*: results of the impact of probiotics for reducing infections in veterans (IMPROVE) study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 14 de Dezembro de 2018;18(1):129. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3028-6>
175. Naqvi SSB, Nagendra V, Hofmeyr A. Probiotic related *Lactobacillus rhamnosus* endocarditis in a patient with liver cirrhosis. *IDCases* [Internet]. 2018;13:e00439. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214250918301434>
176. Valencia D, Valencia V, Fershko A. *Leuconostoc* species endocarditis in an intravenous drug user. *J Cardiol Cases* [Internet]. Julho de 2018;18(1):37–41. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878540918300331>
177. El Rafei A, DeSimone DC, Narichania AD, Sohail MR, Vikram HR, Li Z, et al. Comparison of Dual  $\beta$ -Lactam therapy to penicillin-aminoglycoside combination in treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *J Infect* [Internet]. Novembro de

- 2018;77(5):398–404. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445318301919>
178. Fukuda K. Is it feasible to control pathogen infection by competitive binding of probiotics to the host? *Virulence* [Internet]. 17 de Novembro de 2017;8(8):1502–5. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1382798>
179. Raheem A, Liang L, Zhang G, Cui S. Modulatory Effects of Probiotics During Pathogenic Infections With Emphasis on Immune Regulation. *Front Immunol*. 2021;12(April):1–32.
180. Wan MLY, Forsythe SJ, El-Nezami H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019;59(20):3320–33. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1490885>
181. Strus M, Helwich E, Lauterbach R, Rzepecka-Węglarz B, Nowicka K, Wilińska M, et al. Effects of oral probiotic supplementation on gut *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations and the clinical status of low-birth-weight preterm neonates: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Infect Drug Resist* [Internet]. Setembro de 2018;Volume 11:1557–71. Disponível em:  
<https://www.dovepress.com/effects-of-oral-probiotic-supplementation-on-gut-lactobacillus-and-bif-peer-reviewed-article-IDR>
182. Choi A-R, Patra JK, Kim WJ, Kang S-S. Antagonistic Activities and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Derived From a Plant-Based Fermented Food. *Front Microbiol* [Internet]. 24 de Agosto de 2018;9. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01963/full>
183. Rokana N, Mallappa RH, Batish VK, Grover S. Interaction between putative probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin and *Salmonella*: Impact on intestinal barrier function. *LWT* [Internet]. Outubro de 2017;84:851–60. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643816305072>
184. Fábrega M-J, Rodríguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badía J, Giménez R, et al. Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Front Microbiol* [Internet]. 11 de Julho de 2017;8. Disponível em:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01274/full>
185. Kazemi A, Soltani S, Nasri F, Clark CCT, Kolaheidouz-Mohammadi R. The effect of probiotics, paraprobiotics, synbiotics, fermented foods and other microbial forms on immunoglobulin production: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 4 de Julho de 2021;72(5):632–49. Disponível em:  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637486.2020.1857710>
186. La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins* [Internet]. 31 de Março de 2018;10(1):11–21. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12602-017-9322-6>
187. Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis

- and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 26 de Maio de 2020;17(5):263–78. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41575-019-0261-4>
188. Zhao Q, Yang W-R, Wang X-H, Li G-Q, Xu L-Q, Cui X, et al. Clostridium butyricum alleviates intestinal low-grade inflammation in TNBS-induced irritable bowel syndrome in mice by regulating functional status of lamina propria dendritic cells. *World J Gastroenterol* [Internet]. 28 de Setembro de 2019;25(36):5469–82. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v25/i36/5469.htm>
189. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int* [Internet]. 23 de Outubro de 2018;2018:1–10. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/8063647/>
190. Das DJ, Shankar A, Johnson JB, Thomas S. Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic Lactobacillus. *Nutrition* [Internet]. Janeiro de 2020;69:110567. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900719301303>
191. Fernández Márquez ML, Grande Burgos MJ, López Aguayo MC, Pérez Pulido R, Gálvez A, Lucas R. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiol* [Internet]. Abril de 2017;62:77–81. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002015300629>
192. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Rubayet Ul Alam ASM, Jahid IK. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J Dairy Sci* [Internet]. Fevereiro de 2020;103(2):1223–37. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030219310343>
193. Zheng M, Zhang R, Tian X, Zhou X, Pan X, Wong A. Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 19 de Maio de 2017;8. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00908/full>
194. Riaz Rajoka MS, Mehwish HM, Siddiq M, Haobin Z, Zhu J, Yan L, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk. *LWT* [Internet]. Outubro de 2017;84:271–80. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817303705>
195. Kothari D, Patel S, Kim S-K. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomed Pharmacother* [Internet]. Março de 2019;111:537–47. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218345657>
196. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J Nutr* [Internet]. 1 de Junho de 1995;125(6):1401–12. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/125/6/1401/4730723>
197. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods* [Internet]. Maio de 2010;7(1):1–19. Disponível em: <http://www.atypon-link.com/IFIS/doi/abs/10.1616/1476-2137.15880>

198. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi S, et al. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* [Internet]. 9 de Março de 2019;8(3):92. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/3/92>
199. Bilikallahalli Sannathimmappa M, Nambiar V, Aravindakshan R. Antibiotics at the crossroads - Do we have any therapeutic alternatives to control the emergence and spread of antimicrobial resistance? *J Educ Health Promot*. 2021;10.
200. Meade E, Slattery MA, Garvey M. Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile? *Antibiotics*. 2020;9(1).
201. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol* [Internet]. 2019;27(4):323–38. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>
202. Gradisteanu Pircalabioru G, Popa LI, Marutescu L, Gheorghe I, Popa M, Czobor Barbu I, et al. Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge. *Pharmaceutics*. 2021;13(2):1–15.
203. Simons A, Alhanout K, Duval RE. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*. 2020;8(5).
204. Parker JK, Davies BW. Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development. *Microbiology* [Internet]. 28 de Abril de 2022;168(4). Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.001175>
205. Soltani S, Hammami R, Cotter PD, Rebuffat S, Said L Ben, Gaudreau H, et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(1):1–24.
206. Walsh L, Johnson CN, Hill C, Ross RP. Efficacy of Phage- and Bacteriocin-Based Therapies in Combatting Nosocomial MRSA Infections. *Front Mol Biosci*. 2021;8(April).
207. Hols P, Ledesma-García L, Gabant P, Mignolet J. Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. *Trends Microbiol* [Internet]. Agosto de 2019;27(8):690–702. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X1930071X>
208. Benítez-Chao DF, León-Buitimea A, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Front Microbiol*. 2021;12(April):1–18.
209. Gough R, O'Connor PM, Rea MC, Gómez-Sala B, Miao S, Hill C, et al. Simulated gastrointestinal digestion of nisin and interaction between nisin and bile. *LWT* [Internet]. Dezembro de 2017;86:530–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643817306011>
210. Gough R, Cabrera Rubio R, O'Connor PM, Crispie F, Brodkorb A, Miao S, et al. Oral Delivery of Nisin in Resistant Starch Based Matrices Alters the Gut Microbiota in Mice.

- Front Microbiol [Internet]. 15 de Junho de 2018;9. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01186/full>
211. Ovchinnikov K V., Kranjec C, Thorstensen T, Carlsen H, Diep DB. Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 17 de Novembro de 2020;64(12). Disponível em:  
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00829-20>
  212. Newstead LL, Varjonen K, Nuttall T, Paterson GK. Staphylococcal-produced bacteriocins and antimicrobial peptides: Their potential as alternative treatments for staphylococcus aureus infections. *Antibiotics*. 2020;9(2):1–19.
  213. Mak P. *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*. 1st ed. Savini V, editor. Amsterdam: Elsevier; 2018. 161–171 p.
  214. Caly DL, Chevalier M, Flahaut C, Cudennec B, Al Atya AK, Chataigné G, et al. The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-Clostridium perfringens activity. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. Março de 2017;49(3):282–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857917300092>
  215. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol* [Internet]. 29 de Junho de 2017;8. Disponível em:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01205/full>
  216. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *npj Biofilms Microbiomes* [Internet]. 19 de Dezembro de 2018;4(1):9. Disponível em:  
<http://www.nature.com/articles/s41522-018-0053-6>
  217. Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res* [Internet]. 11 de Dezembro de 2017;48(1):22. Disponível em:  
<http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-017-0425-6>
  218. Barbosa AAT, de Melo MR, da Silva CMR, Jain S, Dolabella SS. Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2021;47(3):376–85. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1893264>
  219. Aarii K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Noguchi K, Komatsuzawa H. Single mutations in BraRS confer high resistance against nisin A in *Staphylococcus aureus*. *Microbiologyopen* [Internet]. 17 de Novembro de 2019;8(11). Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.791>
  220. Porta N, Zschke-Kriesche J, Frieg B, Gopalswamy M, Zivkovic A, Etkorn M, et al. Small-molecule inhibitors of nisin resistance protein NSR from the human pathogen *Streptococcus agalactiae*. *Bioorg Med Chem* [Internet]. Outubro de 2019;27(20):115079. Disponível em:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089619307680>

221. Clemens R, Zschke-Kriesche J, Khosa S, Smits SHJ. Insight into Two ABC Transporter Families Involved in Lantibiotic Resistance. *Front Mol Biosci* [Internet]. 22 de Janeiro de 2018;4. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2017.00091/full>
222. Kawada-Matsuo M, Watanabe A, Ariei K, Oogai Y, Noguchi K, Miyawaki S, et al. Staphylococcus aureus Virulence Affected by an Alternative Nisin A Resistance Mechanism. Julia Pettinari M, editor. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. Abril de 2020;86(8). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02923-19>
223. The Immunisation Advisory Centre. A brief history of vaccination. 2020.
224. Rosini R, Nicchi S, Pizza M, Rappuoli R. Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Front Immunol*. 2020;11(June):1–14.
225. Jansen KU, Anderson AS. The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). *Hum Vaccines Immunother*. 2018;14(9):2142–9.
226. Buchy P, Ascioğlu S, Buisson Y, Datta S, Nissen M, Tambyah PA, et al. Impact of vaccines on antimicrobial resistance. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;90:188–96. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.005>
227. Alghamdi S. The role of vaccines in combating antimicrobial resistance (AMR) bacteria. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2021;28(12):7505–10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.054>
228. Andrews JR, Baker S, Marks F, Alsan M, Garrett D, Gellin BG, et al. Typhoid conjugate vaccines: a new tool in the fight against antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Janeiro de 2019;19(1):e26–30. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918303505>
229. Klugman KP, Black S. Impact of existing vaccines in reducing antibiotic resistance: Primary and secondary effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):12896–901.
230. Buckley BS, Henschke N, Bergman H, Skidmore B, Klemm EJ, Villanueva G, et al. Impact of vaccination on antibiotic usage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Outubro de 2019;25(10):1213–25. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X19303817>
231. Dbaibo G, Amanullah A, Claeys C, Izu A, Jain VK, Kosalaraksa P, et al. Quadrivalent Influenza Vaccine Prevents Illness and Reduces Healthcare Utilization Across Diverse Geographic Regions During Five Influenza Seasons. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. Janeiro de 2020;39(1):e1–10. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/INF.0000000000002504>
232. Centers for Disease Control and Prevention. Pneumococcal Vaccination: What Everyone Should Know [Internet]. *Vaccines and Preventable Diseases*. 2022 [citado 10 de Outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/pneumo/public/index.html>
233. Rappuoli R, Bloom DE, Black S. Deploy vaccines to fight superbugs. *Nature* [Internet]. 12 de Dezembro de 2017;552(7684):165–7. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/d41586-017-08323-0>

234. Olarte L, Kaplan SL, Barson WJ, Romero JR, Lin PL, Tan TQ, et al. Emergence of Multidrug-Resistant Pneumococcal Serotype 35B among Children in the United States. Richter SS, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. Março de 2017;55(3):724–34. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01778-16>
235. World Health Organization. Antibiotic resistance: Why vaccination is important [Internet]. 2017 [citado 10 de Outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/antibiotic-resistance-why-vaccination-is-important>
236. Baker SJ, Payne DJ, Rappuoli R, De Gregorio E. Technologies to address antimicrobial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):12887–95.
237. Creech CB, Frenck RW, Sheldon EA, Seiden DJ, Kankam MK, Zito ET, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a single dose 4-antigen or 3-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine in healthy older adults: Results of a randomised trial. *Vaccine* [Internet]. Janeiro de 2017;35(2):385–94. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16310799>
238. Mohamed N, Wang MY, Le Huec J-C, Liljenqvist U, Scully IL, Baber J, et al. Vaccine development to prevent *Staphylococcus aureus* surgical-site infections. *Br J Surg* [Internet]. 25 de Janeiro de 2017;104(2):e41–54. Disponível em: <https://academic.oup.com/bjs/article/104/2/e41-e54/6123092>
239. Seeberger PH, Pereira CL, Khan N, Xiao G, Diago-Navarro E, Reppe K, et al. A Semi-Synthetic Glycoconjugate Vaccine Candidate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 6 de Novembro de 2017;56(45):13973–8. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201700964>
240. Vrancianu CO, Gheorghe I, Dobre EG, Barbu IC, Cristian RE, Popa M, et al. Emerging strategies to combat  $\beta$ -lactamase producing ESKAPE pathogens. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–46.
241. Angane M, Swift S, Huang K, Butts CA, Quek SY. Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods*. 2022;11(3).
242. Ríos J-L. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. Em: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 3–10. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000018>
243. Stringaro A, Colone M, Angiolella L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. Essential Oils. *Medicines* [Internet]. 21 de Outubro de 2018;5(4):112. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2305-6320/5/4/112>
244. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*. 2019;24(11):1–21.
245. Brnawi WI, Hettiarachchy NS, Horax R, Kumar-Phillips G, Ricke S. Antimicrobial activity of leaf and bark cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* and

- Salmonella typhimurium in broth system and on celery. *J Food Process Preserv* [Internet]. 20 de Março de 2019;43(3):e13888. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.13888>
246. Aljaafari MN, Alali AO, Baqais L, Alqubaisy M, Alali M, Molouki A, et al. An overview of the potential therapeutic applications of essential oils. *Molecules*. 2021;26(3).
247. Ju J, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, Qian H, et al. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2022;62(7):1740–51. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1846494>
248. Ju J, Chen X, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, et al. Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. Outubro de 2019;92:22–32. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419300159>
249. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* [Internet]. 8 de Agosto de 2017;4(3):58. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2305-6320/4/3/58>
250. Al-Saman MA, Abdella A, Mazrou KE, Tayel AA, Irmak S. Antimicrobial and antioxidant activities of different extracts of the peel of kumquat (*Citrus japonica* Thunb). *J Food Meas Charact* [Internet]. 27 de Dezembro de 2019;13(4):3221–9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-019-00244-y>
251. Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* [Internet]. Julho de 2018;120:198–203. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401018305667>
252. Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia* [Internet]. Novembro de 2019;139:104405. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X19317599>
253. Yang S-K, Yusoff K, Thomas W, Akseer R, Alhosani MS, Abushelaibi A, et al. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* [Internet]. 21 de Dezembro de 2020;10(1):819. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-55601-0>
254. Bouyahya A, Abrini J, Dakka N, Bakri Y. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria. *J Pharm Anal* [Internet]. Outubro de 2019;9(5):301–11. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177918305008>
255. Nowotarska S, Nowotarski K, Grant I, Elliott C, Friedman M, Situ C. Mechanisms of Antimicrobial Action of Cinnamon and Oregano Oils, Cinnamaldehyde, Carvacrol, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde, and 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods* [Internet]. 24 de Agosto de 2017;6(9):72. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2304-8158/6/9/72>
256. Wang W, Li D, Huang X, Yang H, Qiu Z, Zou L, et al. Study on Antibacterial and

- Quorum-Sensing Inhibition Activities of *Cinnamomum camphora* Leaf Essential Oil. *Molecules* [Internet]. 21 de Outubro de 2019;24(20):3792. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/20/3792>
257. Ksouda G, Sellimi S, Merlier F, Falcimaigne-cordin A, Thomasset B, Nasri M, et al. Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. *Food Chem* [Internet]. Agosto de 2019;288:47–56. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619304352>
258. Tu X-F, Hu F, Thakur K, Li X-L, Zhang Y-S, Wei Z-J. Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. *Ind Crops Prod* [Internet]. Novembro de 2018;124:192–200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018306666>
259. Abou Baker DH, Al-Moghazy M, ElSayed AAA. The in vitro cytotoxicity, antioxidant and antibacterial potential of *Satureja hortensis* L. essential oil cultivated in Egypt. *Bioorg Chem* [Internet]. Janeiro de 2020;95:103559. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206819314439>
260. El Hamdaoui A, Msanda F, Boubaker H, Leach D, Bombarda I, Vanloot P, et al. Essential oil composition, antioxidant and antibacterial activities of wild and cultivated *Lavandula mairei* Humbert. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. Fevereiro de 2018;76:1–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197817301229>
261. Nirmal NP, Mereddy R, Li L, Sultanbawa Y. Formulation, characterisation and antibacterial activity of lemon myrtle and anise myrtle essential oil in water nanoemulsion. *Food Chem* [Internet]. Julho de 2018;254:1–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618301882>
262. Mutlu-ingok A, Firtin B, Karbancioglu-guler F. Chemical composition and comparative antibacterial properties of basil essential oil against clinical and standard strains of *campylobacter* spp. *ACTA Pharm Sci* [Internet]. 2019;57(2):183. Disponível em: <http://www.actapharmsci.com/doi.php?doi=10.23893/1307-2080.APS.05711>
263. Bouyahya A, Chamkhi I, Guaouguaou FE, Benali T, Balahbib A, El Omari N, et al. Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2020;259(April):112925. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112925>
264. Tammar S, Salem N, Bettaieb Rebey I, Sriti J, Hammami M, Khammassi S, et al. Regional effect on essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. *J Essent Oil Res* [Internet]. 4 de Março de 2019;31(2):129–37. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2018.1539415>
265. El-Jalel LFA, Elkady WM, Gonaid MH, El-Gareeb KA. Difference in chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. essential oil at different altitudes. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. Dezembro de 2018;4(2):156–60. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314724517301231>
266. Mutlu-Ingok A, Devecioglu D, Dikmetas DN, Karbancioglu-Guler F, Capanoglu E. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils:

- an updated review. *Molecules*. 2020;25(20).
267. Owen L, White AW, Laird K. Characterisation and screening of antimicrobial essential oil components against clinically important antibiotic-resistant bacteria using thin layer chromatography-direct bioautography hyphenated with GC-MS, LC-MS and NMR. *Phytochem Anal [Internet]*. Março de 2019;30(2):121–31. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2797>
  268. Ghafari O, Sharifi A, Ahmadi A, Nayeri Fasaei B. Antibacterial and anti-PmrA activity of plant essential oils against fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Lett Appl Microbiol [Internet]*. Dezembro de 2018;67(6):564–9. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/lam.13050>
  269. Lorenzo-Leal AC, Palou E, López-Malo A, Bach H. Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils. *Biomed Res Int [Internet]*. 7 de Maio de 2019;2019:1–8. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/1639726/>
  270. Ostad Asiaei E, Moghimipour E, Fakoor MH. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Eucalyptus camaldulensis* Essential Oil Against the Growth of Drug-Resistant Bacteria. *Jundishapur J Nat Pharm Prod [Internet]*. 23 de Dezembro de 2017;13(4). Disponível em: <https://brief.land/jjnpp/articles/65050.html>
  271. Kryvtsova M V., Salamon I, Koscova J, Bucko D, Spivak M. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosyst Divers [Internet]*. 19 de Julho de 2019;27(3):270–5. Disponível em: <https://ecology.dp.ua/index.php/ECO/article/view/1001>
  272. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules [Internet]*. 9 de Setembro de 2020;25(18):4125. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4125>
  273. Apolónio J, Faleiro ML, Miguel MG, Neto L. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiol Lett [Internet]*. Maio de 2014;354(2):92–101. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/1574-6968.12440>
  274. Yuan Z, Dai Y, Ouyang P, Rehman T, Hussain S, Zhang T, et al. Thymol Inhibits Biofilm Formation, Eliminates Pre-Existing Biofilms, and Enhances Clearance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Peritoneal Implant Infection Model. *Microorganisms [Internet]*. 10 de Janeiro de 2020;8(1):99. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/1/99>
  275. Rosca AS, Castro J, Sousa LGV, França A, Cavaleiro C, Salgueiro L, et al. Six Bacterial Vaginosis-Associated Species Can Form an In Vitro and Ex Vivo Polymicrobial Biofilm That Is Susceptible to *Thymbra capitata* Essential Oil. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(May):1–9.
  276. Yang S-K, Yusoff K, Mai C-W, Lim W-M, Yap W-S, Lim S-H, et al. Additivity vs Synergism: Investigation of the Additive Interaction of Cinnamon Bark Oil and

- Meropenem in Combinatory Therapy. *Molecules* [Internet]. 4 de Novembro de 2017;22(11):1733. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/11/1733>
277. Owen L, Laird K. Synchronous application of antibiotics and essential oils: dual mechanisms of action as a potential solution to antibiotic resistance. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2018;44(4):414–35. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1423616>
278. Aleksic Sabo V, Knezevic P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Ind Crops Prod* [Internet]. Junho de 2019;132(January):413–29. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019301529>
279. Chaves TP, Pinheiro REE, Melo ES, Soares MJ dos S, Souza JSN, Andrade TB de, et al. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Ind Crops Prod* [Internet]. Fevereiro de 2018;112:70–4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669017307331>
280. Limaverde PW, Campina FF, da Cunha FAB, Crispim FD, Figueredo FG, Lima LF, et al. Inhibition of the TetK efflux-pump by the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene against *Staphylococcus aureus* IS-58. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Novembro de 2017;109:957–61. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517300777>
281. de Moraes Oliveira-Tintino CD, Tintino SR, Limaverde PW, Figueredo FG, Campina FF, da Cunha FAB, et al. Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. *Food Chem* [Internet]. Outubro de 2018;262:72–7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461830654X>
282. Agreles MAA, Cavalcanti IDL, Cavalcanti IMF. The Role of Essential Oils in the Inhibition of Efflux Pumps and Reversion of Bacterial Resistance to Antimicrobials. *Curr Microbiol* [Internet]. 2021;78(10):3609–19. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02635-1>
283. de Medeiros VM, do Nascimento YM, Souto AL, Madeiro SAL, Costa VC de O, Silva SMPM, et al. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewioides*. *Microb Pathog* [Internet]. Outubro de 2017;111:468–71. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017300669>
284. Capiello F, Loffredo MR, Plato C Del, Cammarone S, Casciaro B, Quaglio D, et al. The revaluation of plant-derived terpenes to fight antibiotic-resistant infections. *Antibiotics*. 2020;9(6):1–33.
285. Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, Bezirtzoglou E. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*. 2021;9(10):1–28.
286. National Cancer Institute. Monoclonal Antibodies [Internet]. 2019 [citado 28 de Outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about->

cancer/treatment/types/immunotherapy/monoclonal-antibodies

287. Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb Drug Resist.* 2019;25(6):890–908.
288. Wang H, Chen D, Lu H. Anti-bacterial monoclonal antibodies: next generation therapy against superbugs. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2022;106(11):3957–72. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11989-w>
289. Sorensen RU, Edgar D. Specific Antibody Deficiencies in Clinical Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract* [Internet]. Março de 2019;7(3):801–8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213219819300777>
290. Motley MP, Banerjee K, Fries BC. Monoclonal antibody-based therapies for bacterial infections. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. Junho de 2019;32(3):210–6. Disponível em: <http://journals.lww.com/00001432-201906000-00006>
291. Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* [Internet]. 26 de Janeiro de 2017;376(4):305–17. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602615>
292. Tkaczyk C, Semenova E, Shi YY, Rosenthal K, Oganessian V, Warren P, et al. Alanine Scanning Mutagenesis of the MEDI4893 (Suvratoxumab) Epitope Reduces Alpha Toxin Lytic Activity In Vitro and *Staphylococcus aureus* Fitness in Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. Novembro de 2018;62(11). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01033-18>
293. Ruzin A, Wu Y, Yu L, Yu X-Q, Tabor DE, Mok H, et al. Characterisation of anti-alpha toxin antibody levels and colonisation status after administration of an investigational human monoclonal antibody, MEDI4893, against *Staphylococcus aureus* alpha toxin. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2018;7(1):e1009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cti2.1009>
294. Sundin C, Saleeb M, Spjut S, Qin L, Elofsson M. Identification of Small Molecules Blocking the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Protein PcrV. *Biomolecules* [Internet]. 4 de Janeiro de 2021;11(1):55. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/1/55>
295. Jain R, Beckett VV, Konstan MW, Accurso FJ, Burns JL, Mayer-Hamblett N, et al. KB001-A, a novel anti-inflammatory, found to be safe and well-tolerated in cystic fibrosis patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Cyst Fibros* [Internet]. Julho de 2018;17(4):484–91. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199317309840>
296. XBiotech. XBiotech Announces Top-Line Results for 514G3 Antibody Therapy in Serious *Staphylococcus aureus* Infections [Internet]. EUA; 2017. Disponível em: <https://investors.xbiotech.com/node/6796/pdf>
297. Henning LN, Carpenter S, Stark G V., Serbina N V. Development of Protective Immunity in New Zealand White Rabbits Challenged with *Bacillus anthracis* Spores and Treated with Antibiotics and Obiltoximab, a Monoclonal Antibody against Protective

- Antigen. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. Fevereiro de 2018;62(2). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01590-17>
298. Kufel WD, Devanathan AS, Marx AH, Weber DJ, Daniels LM. Bezlotoxumab: A Novel Agent for the Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* [Internet]. Outubro de 2017;37(10):1298–308. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/phar.1990>
299. Navalkele BD, Chopra T. Bezlotoxumab: an emerging monoclonal antibody therapy for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Biol Targets Ther* [Internet]. Janeiro de 2018;Volume 12:11–21. Disponível em: <https://www.dovepress.com/bezlotoxumab-an-emerging-monoclonal-antibody-therapy-for-prevention-of-peer-reviewed-article-BTT>
300. Solbach P, Dersch P, Bachmann O. Individualized treatment strategies for *Clostridium difficile* infections. *Internist (Berl)* [Internet]. 6 de Julho de 2017;58(7):675–81. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00108-017-0268-2>
301. Chahine EB, Cho JC, Worley M V. Bezlotoxumab for the Prevention of *Clostridium difficile* Recurrence. *Consult Pharm* [Internet]. 1 de Fevereiro de 2018;33(2):89–97. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.4140/TCP.n.2018.89>
302. Nielsen TB, Yan J, Slarve M, Lu P, Li R, Ruiz J, et al. Monoclonal antibody therapy against *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun*. 2021;89(10):1–11.
303. François B, Garcia Sanchez M, Eggimann P, Dequin P-F, Laterre P-F, Huberlant V, et al. Suvratoxumab Reduces *Staphylococcus Aureus* Pneumonia in High-Risk ICU Patients: Results of the SAATELLITE Study. Em: B14 LATE BREAKING CLINICAL TRIALS [Internet]. American Thoracic Society; 2019. p. A7358–A7358. Disponível em: [https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1\\_MeetingAbstracts.A7358](https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/ajrccm-conference.2019.199.1_MeetingAbstracts.A7358)
304. Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* [Internet]. Maio de 2021;246:126719. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501321000252>