



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA
FACULDADE DE MEDICINA**

MANUELA MOURA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTÓTIPOS
ANTIBACTERIANOS NA TERAPIA ANTIMICROBIANA DA LISTERIOSE**

**ALTAMIRA - PA
2024**

MANUELA MOURA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTÓTIPOS
ANTIBACTERIANOS NA TERAPIA ANTIMICROBIANA DA LISTERIOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina da UFPA, Campus de
Altamira, como requisito parcial para a obtenção
de grau de Bacharelado em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Tracy Martina M.
Martins.

Coorientador: Prof. Me. Jhon Kennedy Alves
Pereira.

**ALTAMIRA - PA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(s) autor(s)

M929d Moura Rodrigues, Manuela.
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS
PROTÓTIPOS ANTIBACTERIANOS NA TERAPIA
ANTIMICROBIANA DA LISTERIOSE / Manuela Moura
Rodrigues. — 2019.
34 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dra. Tracy Martina M. Martins
Coorientador(a): Prof. Júlio César Gonzaga da Silva
Trabalho de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Altamira, Faculdade de Medicina,
Altamira, 2019.

1. Sulfonamidas. 2. Listeriose. 3. Sepsis. 4. Antibióticos. I.
Título.

CDD 615

MANUELA MOURA RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTÓTIPOS
ANTIBACTERIANOS NA TERAPIA ANTIMICROBIANA DA LISTERIOSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina da UFPA, Campus de
Altamira, como requisito parcial para a obtenção
de grau de Bacharelado em Medicina.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

Banca Examinadora

Dra. Tracy Martina M. Martins (Orientadora)

Me. Júlio César Gonzaga da Silva (Coorientador)

Dr. Luís Antônio Loureiro Maués (Membro examinador)

**ALTAMIRA-PA
2024**

Dedico este trabalho a todos aqueles que estiveram ao meu lado desde o início da jornada até os últimos dias.

À virgem Maria, mãe de Deus, por me proteger e rogar por mim ao Pai, me consolar e me amar, para que eu pudesse prosseguir até o final. Rogai por nós, Santa Mãe de Deus.

Dedico às minhas amigas Ayla, Amanda e Vitória, que foram ombros amigos em que eu pude confiar minhas lágrimas de frustração e felicidade.

Dedico ao meu professor Romy Eduardo, que tanto me incentivou desde o ensino médio a sempre fazer o meu melhor, evidenciando meu potencial. Um pedacinho do senhor sempre esteve aqui e sempre estará em meu coração.

A minha família, meus pais, meus irmãos Pedro, Ali e Milena, meus avós Sindimia e Pedro Moura. Sem vocês eu não teria conseguido.

Dedico, finalmente, as minhas sobrinhas, Maria Júlia e Jude. Vocês me motivam a permanecer onde estou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o meu porto seguro quando as coisas não acontecem da forma que esperamos.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, Maruza e Vicente, que me motivam e me guardam, sempre me lembrando do objetivo maior.

Agradeço ao meu namorado, Walter, por não me deixar desistir e me incentivar sempre nos estudos e na vida, lembrando das minhas motivações a todo momento.

Agradeço de maneira especial a minha orientadora, professora e amiga, Tracy Martina, por ter segurado a minha mão e, com todo o cuidado, dedicação e amor, por ter me guiado nessa jornada de quase um ano de projeto, sempre me colocando pra cima. Você é a melhor orientadora que qualquer aluno poderia sonhar em ter.

Agradeço aos mestres Dr. Ricardo Menegatti, Me. Jhon Kennedy Alves Pereira, Me. Júlio César Gonzaga da Silva, Táric Marques, Luiza Toubas e Prof. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres, pela orientação em cada etapa desde o início do projeto, ensinando como utilizar cada equipamento, como cuidar dos materiais e agentes, mas principalmente por todo conhecimento compartilhado que culminou com o enriquecimento da pesquisa.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás (UFG), pela disponibilização dos espaços e materiais da Faculdade de Farmácia (FF), do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) e do Laboratório de Medicamentos e Alimentos (LAMIMA), onde foi possível realizar todos os processos da pesquisa, bem como seus resultados.

Agradeço à PRAE - Pró Reitoria de Assuntos Estudantis da UFG, que por meio do acesso ao subsídio do Restaurante Universitário (RU) da UFG, nos permitiu diminuir os custos de alimentação durante o período da pesquisa no estado de Goiás.

À dona Irecê e ao seu Necilton, por me ter garantido moradia durante os meses que fiquei em Goiânia junto as minhas colegas para a produção da parte prática da pesquisa.

E, por fim, agradeço as minhas amigas Beatriz, Dálete e Geovana, por terem embarcado nessa jornada junto comigo e pelo apoio de sempre.

RESUMO

Desde os primórdios dos tempos, época em que as bactérias eram desconhecidas, elas já causavam doenças que consumiam a saúde de indivíduos pelo mundo inteiro. Muitas vezes essas mortes eram ocasionadas por casos de sepse e/ou bacteremia. Assim, frequentemente esses quadros sem envolvimento do sistema nervoso central são ocasionados pela bactéria *Listeria monocytogenes*, os quais a taxa de mortalidade por listeriose em pacientes vulneráveis é de até 30%. O tratamento empírico para sepse por listeriose requer a infusão intravenosa de amoxicilina ou ampicilina, e o uso do Sulfametoxazol associado à trimetoprima, uma opção alternativa para pacientes alérgicos, além também de possibilidade do uso combinado com a gentamicina em casos bem mais graves. Assim, fica evidente a necessidade da busca por alternativas para o tratamento antimicrobiano frente à *L. monocytogenes*, pelo emergente limite de opções caso haja aumento de resistência para medicamentos já utilizados no mercado. Desta forma, objetivamos neste trabalho planejar, sintetizar e avaliar a atividade biológica e antibacteriana de novos compostos análogos às sulfonamidas. O planejamento do novo composto se deu a partir da subunidade sulfonamida, observando-se o grupamento funcional, onde elegeu-se a sulfadiazina. O composto planejado demonstrou-se promissor, com todos os parâmetros indicados de verde, conforme o OSIRIS Property Explorer. Os compostos apresentaram atividade antibacteriana, com as Concentrações Inibitórias Mínimas: Sulfametoxipiridazina (SMP) 3,90 µg/mL; BHT aldeído 62,5 µg/mL e composto B1CBH 15,62 µg/mL. O presente estudo demonstrou-se promissor no âmbito da Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I).

Palavras-chave: Sulfonamidas; Listeriose; Sepse.

ABSTRACT

Since the dawn of time, when bacteria were unknown, they have caused diseases that drained the health of individuals worldwide. Often, these deaths were due to cases of sepsis and/or bacteremia. Therefore, frequently, these cases, without central nervous system involvement, are caused by *Listeria monocytogenes*, with a mortality rate from listeriosis in vulnerable patients reaching up to 30%. Empirical treatment for listeriosis-related sepsis requires intravenous infusion of amoxicillin or ampicillin, along with sulfamethoxazole combined with trimethoprim as an alternative for allergic patients, and the possibility of combining it with gentamicin in more severe cases. Thus, the need for alternatives in antimicrobial treatment against *L. monocytogenes* is evident due to the emerging limit of options should resistance to existing medications increase. Therefore, our goal in this study is to design, synthesize, and evaluate the biological and antibacterial activity of new sulfonamide analog compounds. The design of the new compound was based on the sulfonamide subunit, focusing on the functional group, with sulfadiazine chosen. The planned compound showed promise, with all parameters indicated as green according to the OSIRIS Property Explorer. The compounds demonstrated antibacterial activity, with Minimum Inhibitory Concentrations: sulfamethoxypyridazine (SMP) 3.90 µg/mL; BHT aldehyde 62.5 µg/mL; and compound B1CBH 15.62 µg/mL. This study proved promising in the field of Research, Development, and Innovation (R&D).

Keywords: Sulfonamides; Listeriosis; Sepsis.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Sulfametoxazol + trimetoprima	6
Figura 2. Planejamento estrutural	11
Figura 3. Reagentes comerciais e intermediário reacional.	12
Figura 4 - Composto planejado, por hibridação molecular (HM), o qual apresenta-se promissor de acordo com a avaliação <i>in silico</i> OSIRIS <i>Property Explorer</i>	12
Figura 5. Síntese do BHT-aldeído, Adaptado de Fan & colaboradores (Fan et al., 2008).	13
Figura 6 - Síntese do novo análogo, adaptado de Chow & colaboradores (CHOW, 1975).....	14
Figura 7 - Espectro de ¹ H esperado para o composto planejado.	15
Figura 8 - RMN 1H composto MSOLAR1.	16
Figura 9 - Compostos avaliados por microdiluição em caldo.	17
Figura 10 - Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM frente a cepa de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 7644.....	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bactérias, microbiota e antibióticos	1
1.2. Infecções por bactérias de importância médica.....	2
1.3. Seps e listeriose.....	4
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. METODOLOGIA.....	9
3.1. Planejamento estrutural.....	9
3.2. Avaliação do risco de toxicidade <i>in silico</i>:	9
3.3. Procedimento geral para síntese dos compostos análogos às sulfonamidas	9
3.4. Parte experimental da caracterização.....	10
3.5. Avaliação da atividade antibacteriana.....	10
4. RESULTADOS	11
4.1. Planejamento estrutural.....	11
4.2. Avaliação do risco de toxicidade <i>in silico</i>.....	11
4.3. Procedimento geral para síntese dos compostos planejados	12
4.3.1. Procedimento geral para síntese dos compostos 1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1-one-aldeídos.....	13
4.3.2. Procedimento para a síntese dos compostos derivados do intermediário 1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1-one.....	13
4.4. Parte experimental da caracterização.....	14
4.5. Avaliação da atividade antibacteriana.....	16
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias, microbiota e antibióticos

As bactérias são essenciais para a composição da microbiota humana, principalmente no que diz respeito a pele e ao trato gastrointestinal. Esses sistemas utilizam estes microrganismos para auxiliar em mecanismos de defesa, competição, proteção e na aquisição de nutrientes. Estes auxílios são evitados que patógenos oportunistas infectem os órgãos e os tecidos. Mesmo assim, a infecção bacteriana é uma das enfermidades mais comuns entre os seres humanos; e são causadas pela desregulação da coexistência natural das bactérias da microbiota de indivíduos saudáveis e as células bacterianas patogênicas (DEUSENBERY, WANG E SHUKLA, 2021).

Ao longo da história, nota-se o quanto as infecções bacterianas tiveram vantagem significativa sobre os homens. Desde os primórdios dos tempos, onde as mesmas ainda eram desconhecidas, as bactérias já causavam doenças que consumiam a saúde de indivíduos pelo mundo inteiro. Como, por exemplo, os elevados números de mortes por febre pós-parto, pneumonia e entre outros.

Segundo Hutchings, Truman e Wilkinson (2019), as sulfonamidas foram os primeiros antibióticos realmente eficazes na profilaxia e cura de infecções bacterianas e que permanecem em uso até os dias atuais, mesmo sendo amplamente substituídas pela penicilina, após a sua descoberta em 1928, por Alexander Fleming. Alexander Fleming, conseguiu reverter o cenário e o prognóstico de pacientes com infecções bacterianas com a penicilina, o primeiro antibiótico betalactâmico empregado em larga escala na clínica médica mundial. Esta descoberta, juntamente com o emprego das sulfonamidas, iniciaram a grande guerra entre os seres humanos e os microrganismos que compunham a microbiota e as bactérias patogênicas (BATISTA, 2021).

Desde então, diversos estudos inovadores, pautados no conhecimento adquirido dessas bactérias, visando a criação dos antibióticos foram realizados. Informações sobre sua genética, conformação, formas, números, fisiologia e mecanismos de defesas contra o sistema imune foram estudados, testados, caracterizados e classificados no intuito de promover a contribuição teórica para a formulação de novos compostos antimicrobianos (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019).

Segundo Deusenbery, Wang e Shukla (2021), é possível aferir que a importância disso tudo se explica pela diversidade de maneiras em que as bactérias podem ocasionar essa desregulação da microbiota natural do organismo. Além de se propagar de maneira

independente, ainda conseguem o fazer com a ajuda de fatores como a má higienização das mãos dos profissionais e também dos materiais utilizados, por exemplo. Ainda nesse pressuposto, a prática de procedimentos invasivos também pode levar bactérias comuns e não comuns à microbiota humana, mas externas e extremamente patogênicas, até indivíduos sem o preparo da resposta imunológica promovida por vacinas ou com alguma deficiência do sistema imunológico, entre outros, podendo facilitar a migração bacteriana.

Além disso, existe a enorme susceptibilidade do organismo de se infectar, como pela promoção de inflamação, a colonização conjunta de outras bactérias, a formação de biofilme e a promoção da invasão bacteriana por diversos fatores, que podem levar a infecções severas, ocasionando amputação, originando sepse e até levar à morte. Com a dificuldade na descoberta de novos antibióticos e o aumento da resistência bacteriana, a complexidade do tratamento de infecções bacterianas tende a crescer cada vez mais (Ramasco *et al.*, 2024).

1.2. Infecções por bactérias de importância médica

As infecções bacterianas são diferenciadas em diversos tipos, de acordo com o local de infecção e os agentes causadores. As infecções que ocorrem dentro do hospital, por exemplo, são as chamadas Infecções Hospitalares (IH) ou Infecções Nosocomiais, sendo estas, definidas pelo Ministério da Saúde (MS), na Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, infecções adquiridas após a admissão do paciente em unidade hospitalar e que vai se manifestar enquanto o paciente se encontra internado ou até mesmo após a alta, quando é possível interligar o quadro com a própria internação ou com algum procedimento que foi realizado durante a mesma. Hoje conhecidas como Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS), para maior abrangência do termo, incluindo locais e situações que não necessariamente fazem parte do ambiente hospitalar, mas que provêm algum tipo de assistência à saúde, como o próprio termo descreve (ANVISA, 2017).

De acordo com Lopes *et al.* (2015), a origem de cerca de dois terços das IRAS é autógena, ou seja, a infecção se desenvolve a partir da microbiota do próprio paciente, que pode ter origem comunitária ou hospitalar. O hospedeiro da infecção é o elo mais importante da cadeia epidemiológica das IRAS, pois engloba os principais microrganismos que podem desencadear uma infecção. Já no ambiente hospitalar, a patologia já presente nos pacientes pode favorecer a ocorrência de novas infecções ou até o agravamento de colonizações já preestabelecidas no organismo.

Segundo Zehuri e Slob (2018), é estimado que, no Brasil, a taxa de infecção hospitalar seja de 5% a 10% dos casos. Dentre essas infecções, como explicitado por ANVISA (2013),

existem as infecções de corrente sanguínea (ICS), que são multifatoriais e vão apresentar fisiopatologia, critérios diagnósticos diversos e implicações terapêuticas, prognósticas e preventivas distintas. Nesse sentido, o autor ainda afirma que existem dois tipos de síndromes relacionadas: (1) as infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS), que terão consequências sistêmicas maiores, como ocorre na bacteremia ou sepse, sem que haja a determinação do foco primário, o que dificulta a saber se houve envolvimento ou não do cateter venoso central; (2) as infecções relacionadas ao acesso vascular (IAV), que são infecções que vão acontecer no local de inserção de cateter e a maioria delas vai acontecer com o cateter vascular central ou periférico. Além disso, as infecções de corrente sanguínea (ICS) ocasionada no ambiente hospitalar têm uma alta taxa de mortalidade e um tratamento mais complicado que as demais ICS por incluírem a administração de uma combinação de diferentes antibióticos, porém muitas bactérias associadas a esse tipo de infecção possuem resistência a antibióticos (ALMEIDA e FARIAS, 2014).

Nesse mesmo sentido, cabe afirmar que a bacteremia é o termo que designa a indicação da presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea que poderão ou não causar infecção. Segundo o manual das Principais Síndromes Infecciosas elaborado pela ANVISA (2013), a bacteremia primária se dá origem no próprio sistema circulatório do indivíduo ou com a entrada direta dos microrganismos na corrente sanguínea, por meio de agulhas, infusões contaminadas, cateteres e outros dispositivos vasculares relacionados ao tratamento do paciente. A bacteremia secundária acontece pela drenagem de pequenos vasos sanguíneos ou linfáticos, seguindo para a corrente sanguínea, como consequência de um foco infeccioso definido em outra área do organismo. As fontes mais comuns de ICS em geral, englobando as de origem hospitalar e comunitárias são por dispositivos intravasculares, seguidos dos de trato geniturinário, respiratório, intestino e perônio, pele, trato biliar, abscesso intra abdominal, entre outros, sendo o primeiro com uma prevalência de cerca de 19% no total estimado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil, 2017; Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013).

Somado a isso, existem quatro tipos de bacteremias, classificadas em: (1) transitória, (2) intermitente, (3) contínua ou (4) de escape. Na maior parte das vezes, as bacteremias são causadas por um único microrganismo, mas, em alguns casos, podem ocorrer por múltiplos microrganismos. De acordo com Oliveira e Zychar (2019), a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) é um processo que se origina da de alguma lesão causada ao organismo, seja por trauma, queimadura ou a ação de microrganismos, sendo definido pelo quadro em que a pessoa vai se encontrar, com sinais e sintomas específicos dessa síndrome.

Assim, é possível compreender que a sepse nada mais é que a patologia causada pelo conjunto infecção e SRIS, originada quando há uma infecção na corrente sanguínea por fungos, vírus, mas principalmente bactérias. Na tentativa de se proteger, o organismo começa a produzir e liberar mediadores inflamatórios, mas essa tentativa pode levar a um desequilíbrio homeostático generalizado, causando a Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (SDMO). A sepse, levando à consequente SDMO, associadas à alta permeabilidade da barreira endotelial, causando redução da volemia e extravasamento de proteínas plasmáticas, é a principal causa de morte entre pacientes internados em UTIs (Oliveira e Zychar, 2019).

1.3. Sepse e listeriose

A sepse é uma das principais causas de óbitos em lactantes e crianças, em ambos países desenvolvidos e em desenvolvimento, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (AMURRIO, 2023). O tratamento da sepse não é conciso e pré-estabelecido, impossibilitando o cenário dele poder ser replicado em todos os lugares da mesma maneira, pois depende de diversos fatores como o tipo de bacteremia originária (primária, secundária, entre outros), a susceptibilidade para a infecção por microrganismos resistentes, a utilização de antibioticoterapia anterior no mesmo paciente, sendo feito da maneira adequada ou não, ou até mesmo a existência de alergia a antibióticos normalmente utilizados nesse cenário. Todos esses fatores podem influenciar no que se conhece como o tratamento empírico da sepse nos pacientes encontrados em unidades de terapia intensiva.

Dentre os quadros de sepse, destacam-se os ocasionados pela infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*. A *L. monocytogenes* pertencente à família *Listeriaceae*, gênero *Listeria*, é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, catalase positiva e oxidase negativa. Estes são bacilos podem ser curtos ou na forma de coco-bacilos regulares e largos, anaeróbios facultativos, uniformes, não ramificados, apresentando-se isolados ou dispostos em cadeias pequenas. A *L. monocytogenes*, que pode ser encontrada no solo, em material orgânico em decomposição, água, alimentos como carnes, leite e seus derivados, uma vez que faz parte da microbiota de vários mamíferos, aves, peixes e insetos (ANVISA 2013; SOUZA et al., 2021).

Estas bactérias são psicotrópicas, ou seja, são capazes de se multiplicar em temperaturas menores que 7°C, independente da sua temperatura ótima de crescimento (ANVISA 2013; Schlech, 2019; SOUZA et al., 2021). Assim, agem com certa competitividade contra outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em ambientes refrigerados. De acordo com os dados levantados por Schlech (2019), cerca de 15% de vegetais e carnes têm uma contaminação

superficial desse microrganismo. Ademais, o trato gastrointestinal dos indivíduos acometidos, pode funcionar como hospedeiro intermediário deste patógeno.

Koopmans et al. (2023) explica que a *L. monocytogenes* é um patógeno que se difunde pelo ambiente e pode ser isolado no solo, lençóis freáticos e fezes de animais e humanos. É um organismo que se adapta facilmente ao ambiente e pode sobreviver em condições adversas, incluindo temperaturas frias, acidez e alta concentração de sal, sendo tão adaptativo que usa cerca de 7% do seu genoma para sua regulação adaptativa em relação ao ambiente em que ele se encontra. Dessa maneira, é possível entender que é um microrganismo extremamente difícil de lidar pela sua adaptabilidade, resistência e foco infeccioso, os quais se encontram diversos outros microrganismos que podem ajudar na contaminação pela contaminação conjunta.

A infecção por *L. monocytogenes*, a chamada Listeriose, é principalmente de origem alimentar, sendo contraída pela ingestão de produtos alimentares contaminados como carne processada, peixe defumado a frio, legumes preparados, saladas e frutas. A infecção por *L. monocytogenes* pode ocasionar diarreia, febre e cólicas abdominais, sendo estes iniciados de 9 a 32 horas após a infecção. A *L. monocytogenes* é uma das etiologias de processos infecciosos do sistema nervoso central (SNC), principalmente no período neonatal, que acomete pacientes de 0 a 20 dias de vida, e é responsável por 8% dos casos (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013)

A Listeriose humana varia de subclínica à gastroenterite não complicada para doença invasiva grave. A Listeriose invasiva é classificada em 3 formas clínicas: (1) listeriose neonatal e associada à gravidez (14%); (2) bacteremia por listeriose ou sepse por listeriose (52%); (3) infecção de sistema nervoso central ou neuro-listerioses (31%). A incidência dos casos de listeriose neonatal associada à gravidez, é de 1.3 a 25 casos a cada 100.000 nascidos vivos. Concomitantemente, há casos de listerioses reportadas como IRAS e de risco iatrogênico, acometendo os pacientes vulneráveis como os idosos, pacientes imunodepressivos e em terapia imunossupressora, podendo ocorrer também por situações de infecção cruzada com os pacientes neonatos do primeiro grupo alvo (KOOPMANS et al., 2023).

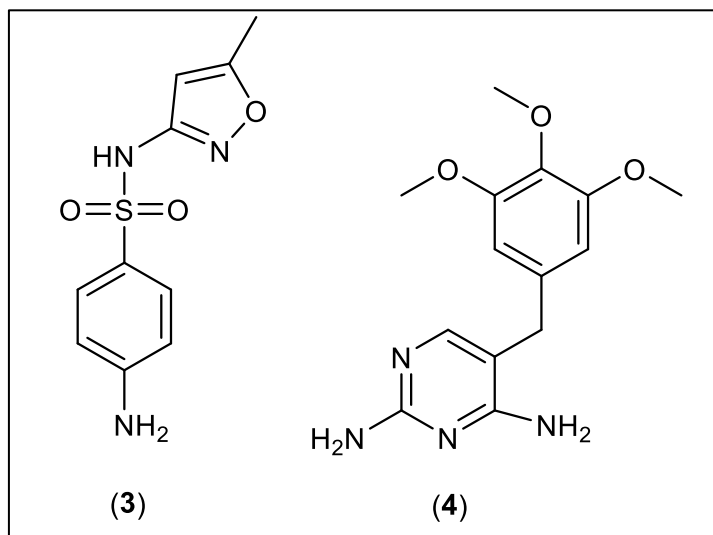
Segundo Cuellar et al. (2021), em mais de 70% dos casos de listeriose acontece nesses grupos com vulnerabilidade. Nos casos de pacientes oncológicos, 31% dos casos de um estudo peruano são pacientes que têm outras comorbidades como hipertensão arterial, cirrose, diabetes mellitus, hipotireoidismo, esquizofrenia, hepatite, entre outros. No momento da admissão, impressionantes 93,1% dos pacientes manifestaram critérios característicos de sepse.

A *L. monocytogenes*, detém importância significativa quando se trata de pacientes idosos, além dos imunocomprometidos, podendo causar meningite, encefalite ou sepse. Já em pacientes grávidas, podem gerar amnionite, que é a infecção do líquido amniótico que entorna o bebê, além de infecções no próprio bebê desencadeando o aborto, provocando a parto prematuro, meningite e sepse neonatal insetos (ANVISA 2013; SOUZA et al., 2021).

A sepse ou uma bacteremia sem envolvimento do sistema nervoso central ocasionada pela infecção por *L. monocytogenes* representa cerca de um terço dos casos de listeriose invasiva em adultos (SCHLECH, 2019). Segundo Fotopolou et al. (2024), a taxa de mortalidade por listeriose em pacientes vulneráveis é de 20-30%, sendo que, em um estudo feito em Taiwan, que analisou a performance de sistemas de score na evolução e prognóstico envolvendo 39 pacientes com bacteremia por *L. monocytogenes* positiva, a taxa de mortalidade chegou a alcançar quase 37% dos casos (HUANG, et al., 2021).

O tratamento empírico para sepse por listeriose requer a infusão intravenosa de amoxicilina ou ampicilina, sendo o uso de Sulfametoxazol + trimetoprima, Figura 1, é uma opção alternativa para pacientes alérgicos, além também da possibilidade do uso combinado com a gentamicina em casos bem mais graves (FOTOPOULOU et al., 2024).

Figura 1. Sulfametoxazol + trimetoprima



Fonte: Adaptado de Bovet, 1993.

Mesmo não tendo um número elevado, a resistência microbiana da *L. monocytogenes* a penicilinas, ampicilinas, macrolídeos, fluoroquinolonas e, principalmente, às tetraciclina, em alguns casos reportados, foram relacionados às bombas de efluxo, de acordo com o mesmo estudo. Além desse cenário, também há a transferência de genes resistente entre espécies de

Listeria e outras bactérias como *Enterococcus* e *Streptococcus* por meio de plasmídeos “autotransferíveis” sendo demonstrada (LUQUE-SASTRE et al., 2018).

Assim, fica evidente a necessidade da busca por uma nova alternativa para o tratamento antimicrobiano de sepse por *L. monocytogenes*, pelo emergente limite de opções caso haja aumento de resistência para medicamentos já utilizados no mercado. A procura por novos compostos que tenham o mesmo ou até um melhor poder terapêutico contra essas bactérias que podem promover a sepse, além de menores efeitos colaterais com seu uso. A busca por esses compostos análogos às sulfonamidas pode mudar a realidade dos pacientes que sofrem com essas infecções nos meios em que encontram assistência em saúde, principalmente por proporcionar a possibilidade da redução de formação de cepas super-resistentes aos medicamentos já encontrados no mercado farmacológico. Desta forma, este trabalho objetivou conduzir a busca pelo desenvolvimento e síntese de novo protótipo de fármaco análogo às sulfonamidas para futura utilização de opção para esse tipo de terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Planejar, sintetizar e avaliar a atividade biológica e antibacteriana de novos compostos análogos às sulfonamidas.

2.2. Objetivos específicos

- a) Planejar a criação de um composto, protótipo de fármaco antibiótico, análogo às sulfonamidas.
- b) Analisar a atividade biológica e/ou risco de toxicidade *in silico* por meio do software OSIRIS Property Explorer.
- c) Sintetizar, purificar e caracterizar por meio da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e/ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) os compostos obtidos.
- d) Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de um protótipo de sulfonamida (LQFM396), de um agente antioxidante (BHT), e do antibiótico sulfametoxipiridazina, frente a cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*®) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

3. METODOLOGIA

O presente estudo denomina-se um Projeto de Pesquisa, cujo foco remete acerca da criação de análogos às sulfonamidas, com objetivo de conter cepas de *L. monocytogenes*. Foi idealizado nas dependências da Universidade Federal do Pará (UFPA) Campus Altamira e realizado nas dependências da Universidade Federal de Goiás (UFG), especificamente na Faculdade de Farmácia (FF), no Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) e no Laboratório de Medicamentos e Alimentos (LAMIMA), sob orientação da Prof. Dra. Tracy Martina Marques Martins, do Dr. Ricardo Menegatti, do Me. Jhon Kennedy Alves Pereira e do Me. Júlio César Gonzaga da Silva, durante os meses de Janeiro a Março de 2024.

3.1. Planejamento estrutural

O planejamento do novo composto análogo às sulfonamidas criou padrões estruturais inéditos, contemplando, em sua estrutura, as subunidades farmacofóricas presentes nos antibióticos da classe das sulfonamidas. O novo padrão estrutural planejado está de acordo com as cinco regras de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997).

3.2. Avaliação do risco de toxicidade *in silico*:

Para avaliação da atividade biológica e risco de toxicidade dos compostos e de seus intermediários, utilizou-se o OSIRIS *Property Explorer*. O OSIRIS avalia e calcula os principais parâmetros para avaliação preliminar e planejamento estrutural de medicamentos. Os resultados da previsão *in silico* são calculados e classificados por cores. Propriedades com altos riscos de efeitos indesejados, como má absorção intestinal e risco de toxicidade são mostradas em vermelho. Em geral, a cor verde indica semelhança e compatibilidade com os fármacos aprovados e utilizados na atualidade (Sander, 2017).

3.3. Procedimento geral para síntese dos compostos análogos às sulfonamidas

Em um balão reacional de fundo redondo com capacidade de 50-100 mL, foram adicionados em proporção 1:1, 1mmol de cada reagente de partida, o solvente orgânico e um agente catalisador. A mistura reacional permaneceu em refluxo, com auxílio de um condensador. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), sequencialmente a mesma foi extraída com acetato de etila e água. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório (Borges *et al.*, 2023; Brito *et al.*, 2018; Finar e Godfrey, 1954; Oliveira, De *et al.*, 2011, 2013). Todos os procedimentos de síntese, purificação e caracterização foram realizados sob supervisão dos Professores Dr. Ricardo Menegatti, Me. Jhon Kennedy Alves Pereira e Dra. Tracy Martina Marques Martins, nas dependências do

Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM), localizado na Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.4. Parte experimental da caracterização

Os compostos sintetizados foram caracterizados através das metodologias convencionais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Os espectros de RMN foram obtidos no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em um equipamento de RMN *Bruker Avance III 500* (campo de 11,75 Tesla: 500,13 MHz para a frequência do hidrogênio e 125,76 MHz para o carbono).

As amostras dos protótipos sintetizados foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6), tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS). A aquisição e processamento dos dados e dos espectros foram realizadas utilizando o *software Bruker TopSpin* (versão 4.0.9).

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas de alumínio Whatman 20x20 cm revestidas com sílica gel 60 F254 e espessura de 0,25mm, empregando-se como fase móvel n-hexano acetato de etila (70:30) e visualização e detecção por lâmpada ultravioleta (254 e 365 nm).

3.5. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM foi realizada frente a cepa de referência ATCC (*American Type Culture Collection*®) da bactéria *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644. Os testes com esta bactéria foram realizados sob supervisão da Prof. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres e da Prof. Dra. Tracy Martina Marques Martins, nas dependências do Laboratório de Microbiologia de Medicamentos e Alimentos (LAMIMA), localizado na Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

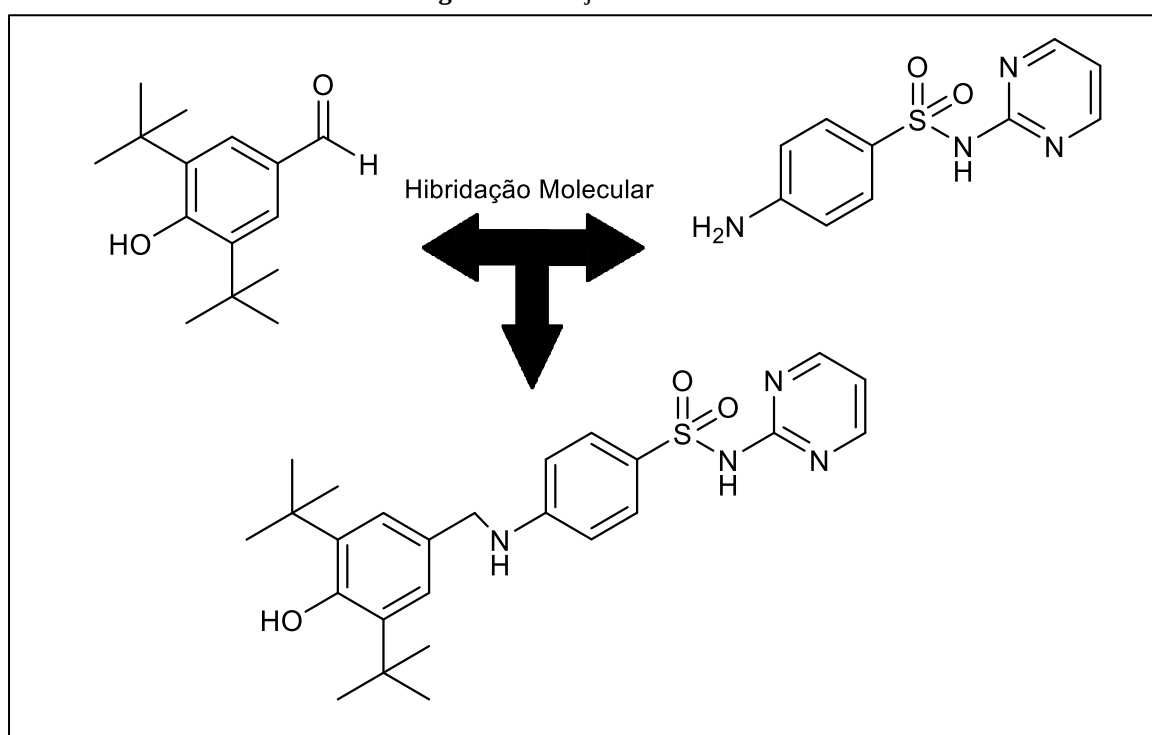
Para a avaliação da atividade antibacteriana dos compostos, adotou-se os procedimentos metodológicos padronizados pelos colaboradores, por meio da microdiluição em caldo, com placas de 96 poços (Wiegand, Hilpert e Hancock, 2008). Tais procedimentos estão em consonância com os métodos microbiológicos clássicos recomendado pelo: CLSI - *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS, 2003), EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*).

4. RESULTADOS

4.1. Planejamento estrutural

O planejamento estrutural do novo composto se deu a partir da subunidade sulfonamidas. Observando-se o grupamento funcional, elegeu-se a sulfadiazina. Neste sentido, nos propomos a fazer nos análogos 1-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1-one ligados às subunidades sulfonamidas. Os novos padrões estruturais desenhados contemplam em suas estruturas as subunidades farmacofóricas, e é inédito, de acordo com a base de dados *SciFinder*.

Figura 2. Planejamento estrutural

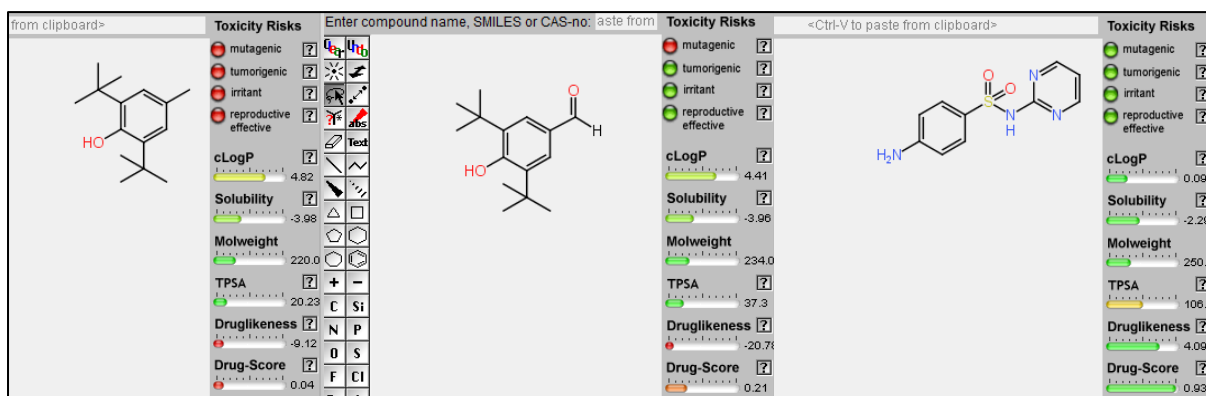


Fonte: Autoria própria, 2024.

4.2. Avaliação do risco de toxicidade *in silico*

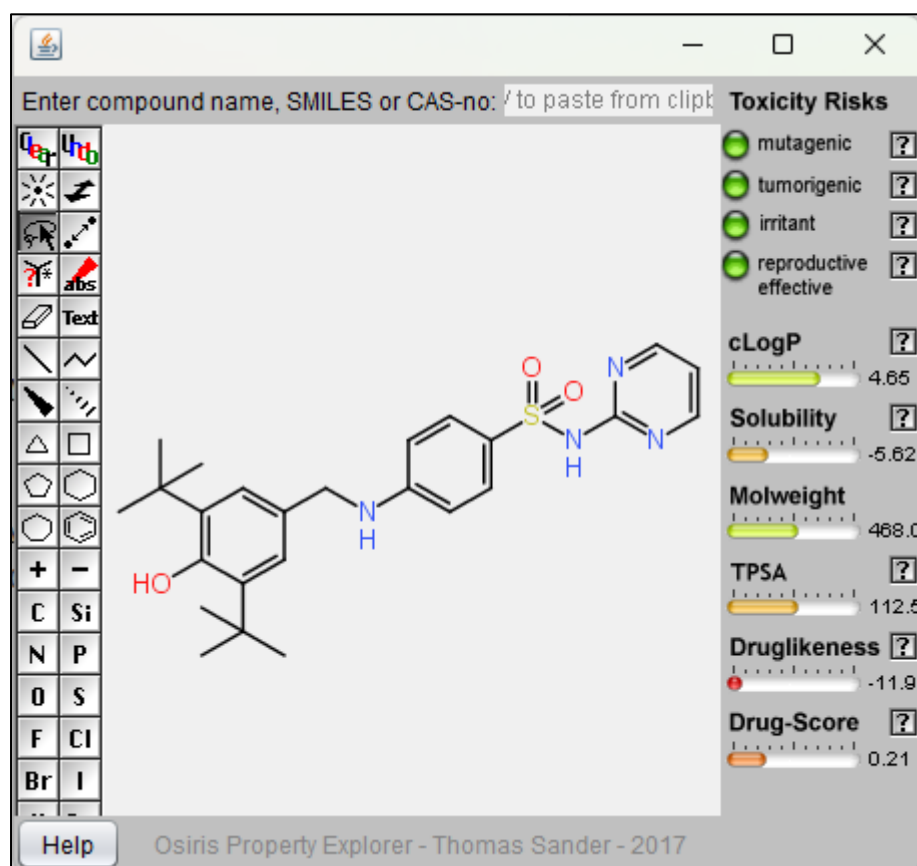
Análise dos parâmetros de avaliação de atividade biológica e *screening in silico*, subsidiando as etapas práticas de síntese. Os reagentes de partida e intermediários reacionais demonstraram-se com maior potencial de mutagenicidade. O composto planejado demonstrou-se promissor, com todos os parâmetros indicados de verde.

Figura 3. Reagentes comerciais e intermediário reacional.



Fonte: Autoria própria via OSIRIS Property Explorer, 2024.

Figura 4 - Composto planejado, por hibridação molecular (HM), o qual apresenta-se promissor de acordo com a avaliação *in silico* OSIRIS Property Explorer.



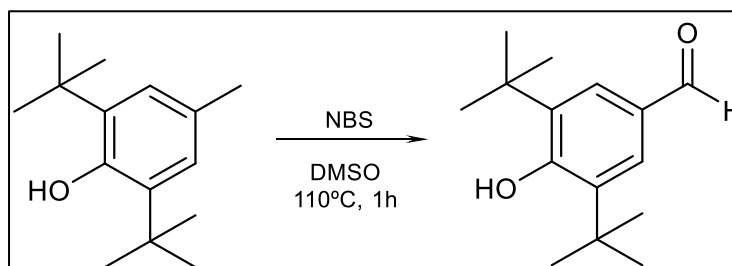
Fonte: Autoria própria via OSIRIS Property Explorer, 2024.

4.3. Procedimento geral para síntese dos compostos planejados

4.3.1. Procedimento geral para síntese dos compostos 1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1-one-aldeídos

Em um balão reacional de fundo redondo com capacidade de 250 mL, foram adicionados 1 grama de di-terc-butil-metil-fenol ou hidroxitoluenobutilado (BHT – *Sigma Aldrich*® CAS128-37-0) com 15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura reacional foi colocada sob agitação à temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos. Sequencialmente, adicionou-se aos poucos 1 grama de n-bromosuccinamida (NBS), acoplou-se um condensador e elevou-se a temperatura à 110°C por 1 hora (Fan *et al.*, 2008). Ao término da reação a mistura reacional foi vertida em água e purificada com lavagem de hexano à frio.

Figura 5. Síntese do BHT-aldeído, Adaptado de Fan & colaboradores (Fan *et al.*, 2008).



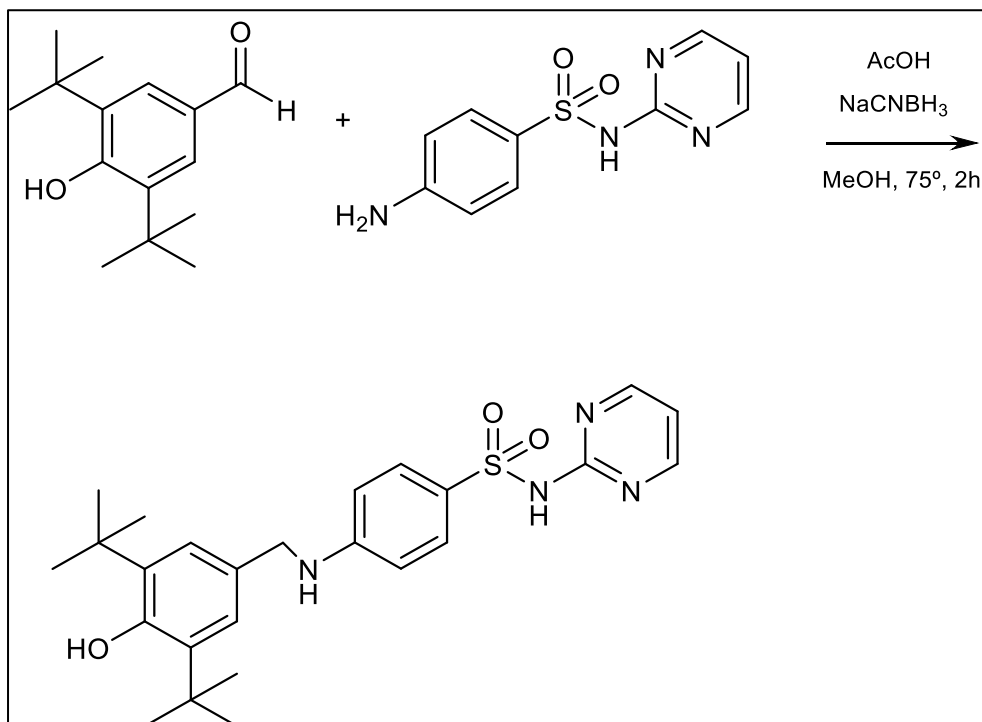
Fonte: Autoria própria, 2024.

4.3.2. Procedimento para a síntese dos compostos derivados do intermediário 1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethan-1-one

Em um balão reacional de fundo redondo com capacidade de 50 mL adicionou-se 0,238g de BHT aldeído, 11mL de etanol e 0,2512g de sulfadiazina. Após isso, foi analisado o pH da mistura, o qual encontrou-se quase neutro, havendo a necessidade da adição de 7 gotas de ácido acético ($\approx 0,14\text{mL}$). Foi colocado sob refluxo durante 30 minutos. Adicionou-se uma pontinha de espátula de cianoboridreto de sódio (CHOW, 1975). A reação foi deixada na manta em refluxo por mais 4 horas. A reação foi analisada em placa de CCD, onde foi percebido subproduto sobrando. Foi feito também a visualização e análise pelo iodo I3 e pelo revelador de aldeído. Comparando os resultados, foi possível perceber a formação de um produto. Após o tempo reacional, a reação foi vertida em água acidificada com ácido clorídrico (HCl) {50ml de água + 1ml de HCl + produto reacional}, com a reação ainda morna, recém tirada da manta. Após ser vertida, precipitou. O precipitado foi filtrado em papel de filtro e o sólido foi deixado

em temperatura ambiente para a secagem até o outro dia. O composto foi lavado com Hexano e analisado por CCD e RMN. O material enviado para análise foi denominado de MSOLAR1.

Figura 6 - Síntese do novo análogo, adaptado de Chow & colaboradores (CHOW, 1975).

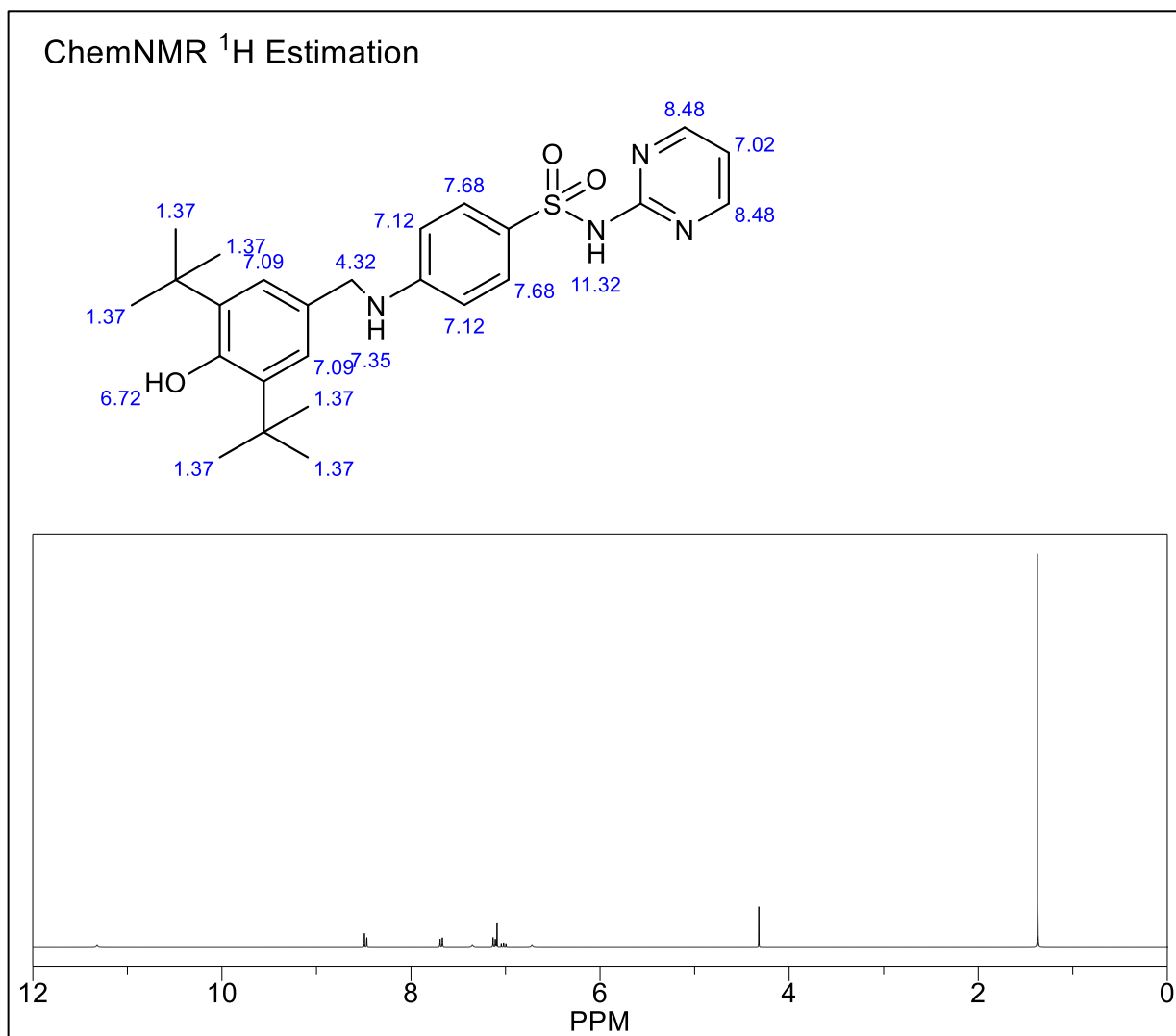


Fonte: Autoria própria, 2024.

4.4. Parte experimental da caracterização

Os compostos foram caracterizados utilizando a metodologia convencional de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Complementarmente, utilizou-se os recursos de predição fornecidos pelo *software ChemDraw®*, conforme ilustrado na figura 7.

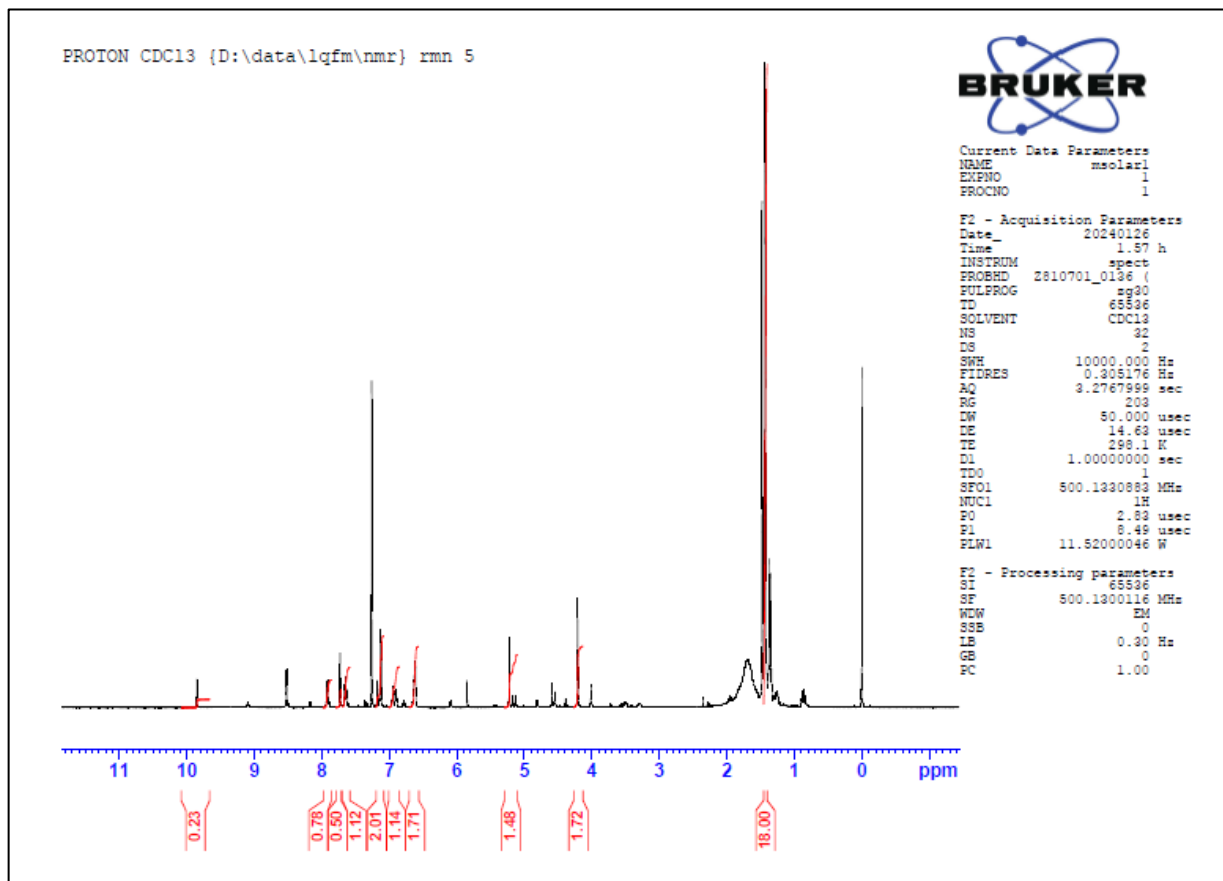
Figura 7 - Espectro de ^1H esperado para o composto planejado.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A Figura 7 ilustra o padrão de sinais esperados para análise do composto MSOLAR1, a formação do sinal singlete em 4.32 indicaria o sucesso da reação, com a hibridação molecular do aldeído BHT com a sulfadiazina. Contudo, a análise do composto enviado demonstrou-se divergente do espectro esperado de RMN, demonstrando que houve a formação do produto esperado (Figura 8), contudo, observou-se que o produto não apresentou o grau de pureza necessário para realização das demais etapas de caracterização estrutural e nem para avaliação da atividade antibacteriana, optando-se assim, por fazer a avaliação de compostos semelhantes.

Figura 8 - RMN 1H composto MSOLAR1.



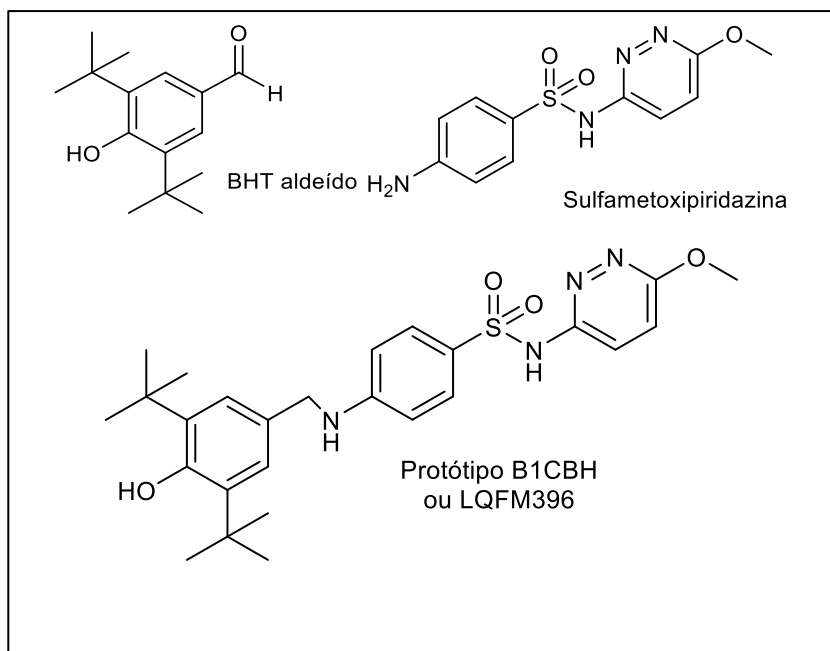
Fonte: autoria própria (2024)

4.5. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada com compostos estruturalmente relacionados aos compostos planejados. Os compostos testados foram sintetizados pelo Grupo Multidisciplinar de Estudos e Pesquisas em Saúde (GRUMEPS), por meio da parceria da Faculdade de Farmácia da UFG com a Faculdade de Medicina da UFPA-CALTA.

Assim, conforme Figuras 8 e 9, avaliou-se a atividade antibacteriana da sulfametoxipiridazina (SMP), do primeiro intermediário reacional, o aldeído do BHT, obtido conforme figura 5, e um protótipo experimental, também análogo às sulfonamidas, denominado de B1CBH.

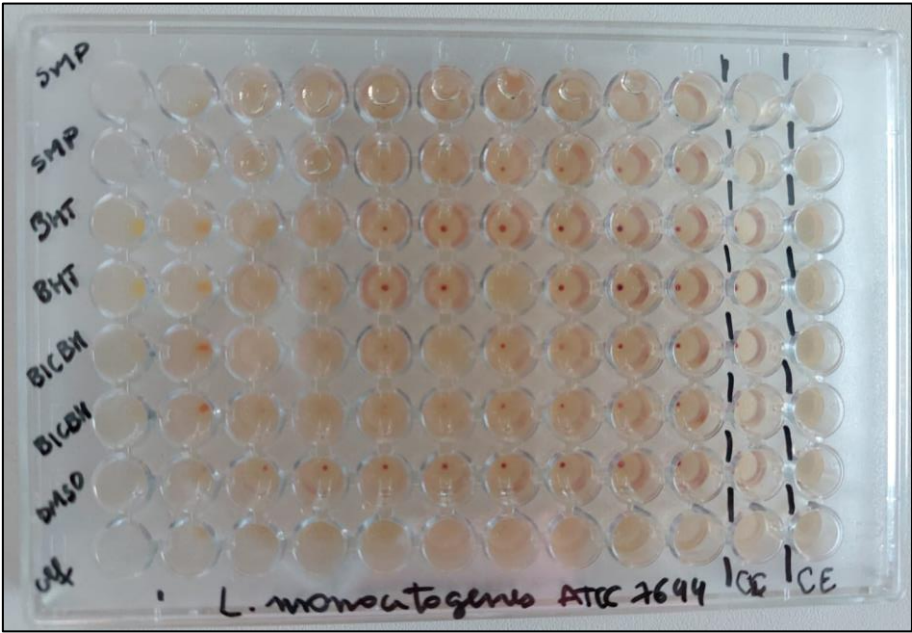
Figura 9 - Compostos avaliados por microdiluição em caldo.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Os compostos apresentaram atividade antibacteriana, Figura 10, com as CIM's SMP 3,90 µg/mL; BHT aldeído 62,5 µg/mL e B1CBH 15,62 µg/mL. O antibiótico Ceftriaxona (Cef), foi utilizado como controle.

Figura 10 - Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM frente a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644



Fonte: Autoria própria, 2024.

5. DISCUSSÃO

Gooldman & Gilman (2018), inferem que o termo “sulfonamidas” é um nome genérico para referir-se aos derivados da para-aminobenzeno-sulfonamida (sulfanilamida). Na atualidade as sulfonamidas são utilizadas de maneira abrangente, como o sulfametoxazol em combinação com a trimetoprima, tornando alvos microrganismos específicos, a partir de meados de 1970 (Brunton, Hilal-Dandan e Knollmann, 2018). Entretanto, o seu uso reduzido se dá pelo crescente aumento de resistência bacteriana dos fármacos existentes no mercado, sem outras opções de análogos com a presença de anel betalactâmico para o tratamento específico de doenças bacterianas.

Estima-se que, em 2017, o mundo somou 49 milhões de casos de sepse, sendo que, destes, 11 milhões evoluíram para o óbito. Assim, a mortalidade por este quadro é de aproximadamente 20% dos casos. Tal fato imprime a importância do tratamento efetivo da sepse, não apenas centrado no tipo de antibioticoterapia, mas principalmente levando em consideração todos os fatores de risco relacionados e o também o tempo de identificação do quadro séptico até o seu diagnóstico para o início da terapêutica são essenciais para um bom prognóstico pós admissional.

Partindo desse princípio, a conduta correta desde a chegada do paciente no ambiente hospitalar ou até mesmo já nas unidades de terapia intensiva é o que vai definir o prognóstico do paciente. Levando em consideração uma abordagem ideal, à admissão de um paciente pode ser feita a avaliação da sua situação e, nesse primeiro momento, já conseguir identificar sinais e sintomas que indiquem um quadro séptico nesse paciente ou até mesmo um alerta de uma possível evolução para uma septicemia, evitando assim a evolução para o óbito (CHOY et al., 2022).

Mesmo com a incidência de sepse aumentando, a implementação e desenvolvimento de protocolos e diretrizes estão reduzindo a taxa de mortalidade. A tentativa de desenvolver e introduzir uma diretriz para o tratamento de pacientes com sepse iniciou com a intenção de definir critérios globais de detecção precoce da sepse e a definição de recomendações para a implementação de alguns procedimentos terapêuticos, no intuito de melhorar a efetividade do tratamento e reduzir a taxa de mortalidade em 25% em 5 anos da implementação (RAMASCO et al., 2024).

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos protótipos antibióticos é um dos objetivos mundiais na luta contra a resistência bacteriana e as altas taxas de mortalidade por bacteremias e outros distúrbios relacionados à infecção bacteriana no organismo humano. Para além disso, os análogos, que são compostos não necessariamente antibióticos também podem atuar como adjuvantes na terapia antimicrobiana dessas moléstias, atuando no aumento da eficácia do fármaco antibiótico utilizado, dando uma boa margem para a criação de mais protótipos análogos aos medicamentos hoje amplamente utilizados com esse mesmo objetivo: suprimir bactérias patogênicas. Nesse sentido, é possível compreender que o tratamento antimicrobiano contra doenças bacterianas não se resume a uma caixa delimitada, mas que tem possibilidade de expansão maior do que uma fez já previsto pelo cenário mundial.

O presente estudo demonstrou-se promissor no âmbito da Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I), uma vez que o mesmo contemplou todos os objetivos propostos e foi conduzido com critérios científicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2017). Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde 2. **Série: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**. Brasília, 2017.
- 2 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2013). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. **Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas**. Brasília, 2013.
- 3 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2013). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. **Módulo 6: Detecção e Identificação de bactérias de importância médica**. Brasília, 2013.
- 4 ALMEIDA, Z. G. De, & FARIAS, L. R. (2014). Investigação Epidemiológica Das Principais Infecções Nosocomiais No Brasil e Identificação Dos Patógenos Responsáveis: Uma Revisão Bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa Em Ciências Da Saúde**, 1(2), 49–53.
- 5 AMURRIO, R. D. A. (2023). Sepsis em unidade de terapia intensiva. **Revista Interdisciplinar do Pensamento Científico**, v. 9, n. 1, 13 ago. 2023. D.O.I: <http://dx.doi.org/10.20951/2446-6778/v9n1a7>.
- 6 BATISTA, Y. de A. et al. (2021). Consequências da resistência antimicrobiana no tratamento das infecções hospitalares. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 29952-29967.
- 7 CHOY, C. L. et al. (2022). Impact of sepsis education for healthcare professionals and students on learning and patient outcomes: a systematic review. **Journal of Hospital Infection**, Volume 122, 84 - 95. DOI: 10.1016/j.jhin.2022.01.004
- 8 CHOW, M. C. (1975). Amine catalysis of the reduction of ketone with schow, m. C. Amine catalysis of the reduction of ketone with sodium cyanoborohydride. **Soochow Journal of Mathematical & Natural Sciences**, v. 1, 1975. ODIUM CYANOBOROHYDRIDE. Soochow Journal of Mathematical & Natural Sciences, v. 1, 1975.
- 9 CUÉLLAR, L. E. et al. (2021). Bacteriemia por listeria en pacientes de un instituto oncológico en peruano, 2005-2015. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(1):108-12. DOI: <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2021.381.5488>.
- 10 DEUSENBERRY, C.; WANG, Y.; SHUKLA, A. (2021). Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v 7, p 695–720.
- 11 FAN, J. C.; SHANG, Z. C.; LIANG, J.; LIU, X. H.; LIU, Y. (2008). The oxidation of alcohols to aldehydes and ketones with N-bromosuccinimide in polyethylene glycol: An experimental and theoretical study. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 945–953, 2008.

- 12 FOTOPOULOU, E. T.; JENKINS, C.; PAINSET, A.; AMAR, C. (2024). *Listeria monocytogenes*: the silent assassin. **Journal of Medical Microbiology** 2024; 73:001800. DOI: 10.1099/jmm.0.001800
- 13 HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, 51:72–80, 2019.
- 14 KOOPMANS, M. M. et al. Human Listeriosis (2023). **Clinical Microbiology Reviews**, march 2023, v 36, i 1. 10.1128/cmr.00060-19.
- 15 LOPES, G. D. et al. (2015). A infecção hospitalar no centro cirúrgico. A sistematização da assistência de enfermagem em infecção hospitalar. **Revista Thêma et Scientia**, Edição Especial Enfermagem. Vol. 5, no 1E, jan/jun.
- 16 LUQUE-SASTRE, L. et al. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. **Microbiol Spectrum** 6(4):ARBA-0031-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0031-2017.
- 17 MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL (1998). Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 15 maio. Seção I.
- 18 OLIVEIRA, M. V. do N.; ZYCHAR, B. C. (2019). Mecanismos moleculares da síndrome da resposta inflamatória sistêmica em vigência da sepse. **InterfacEHS - Revista de Saúde, Meio ambiente e Sustentabilidade** Vol. 14 no. 2 – Dezembro, São Paulo: Centro Universitário Senac ISSN 1980-0894.
- 19 SANDER, T. (2024). **OSIRIS Property Explorer**. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 10 jul. 2024.
- 20 SCHLECH, W. F. (2019). Epidemiology and Clinical Manifestations of *Listeria monocytogenes* Infection. **Microbiology Spectrum** 7(3):GPP3-0014-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018.
- 21 SOUZA, N. F. D. et al. (2021). Principais aspectos de *Listeria monocytogenes* e sua importância para a saúde pública. **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal, SP, v.37, n.4, 264-272, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2021v37n4p264-272>.
- 22 ZEHURI, M. M. O. N.; SLOB, E. M. G. B. (2018). Auditoria em saúde: controle das IRAS, economia, higienização das mãos e antimicrobianos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, vol.12, n.10.