

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA NEVES DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ESCHERICH (1885)
ISOLADA DO RIO ALEGRIA NO MUNICÍPIO DE MEDIANEIRA - PR**

MEDIANEIRA

2023

PALOMA NEVES DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ESCHERICH (1885)
ISOLADA DO RIO ALEGRIA NO MUNICÍPIO DE MEDIANEIRA - PR**

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli* ESCHERICH (1885)
ISOLATED FROM RIO ALEGRIA IN THE MUNICIPALITY OF MEDIANEIRA - PR**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Antonia Bartolomeu
Agustini

MEDIANEIRA

2023



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

PALOMA NEVES DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ESCHERICH (1885)
ISOLADA DO RIO ALEGRIA NO MUNICÍPIO DE MEDIANEIRA – PR**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 23 de junho de 2023

Márcia Antonia Bartolomeu Agustini
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Juliane Maria Bergamin Bocardi
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Valdemar Padilha Feltrin
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

MEDIANEIRA

2023

Dedico este trabalho aos meus avós que faleceram durante a minha graduação e aos meus pais e irmãs, por sempre me apoiarem e incentivarem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela benção da vida e por me fortalecer durante toda a caminhada.

Aos meus pais e irmãs, por sempre estarem comigo e me darem todo suporte. Por me apoiarem, incentivarem e não medirem esforços para que tudo isso fosse possível.

A minha orientadora Márcia, que foi de extrema importância para que esse trabalho fosse executado. Agradeço pela paciência, dedicação, pela confiança e por todos os ensinamentos.

A família Colussi, que tenho um grande carinho e amizade, por sempre terem me ajudado em todos os momentos que precisei e por terem tornado essa caminhada mais leve.

A minha querida amiga Eduarda, que esteve comigo desde o começo ao fim dessa graduação.

Ao meu namorado Diogo, pelo companheirismo, por sempre me incentivar e me apoiar.

A minha banca, Juliane Bocardí e Valdemar Padilha, por todas as contribuições necessárias para aperfeiçoar este trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para a minha formação acadêmica.

RESUMO

Os recursos hídricos são corpos receptores de efluentes brutos e tratados, que recebem diariamente fármacos e microrganismos que interagem no ambiente aquático, como exemplo a *Escherichia coli* (*E. coli*), que é de origem fecal e muitas vezes patogênica. Pela exposição constante aos antimicrobianos, muitas bactérias tornam-se resistentes à antibióticos nestes ambientes, que por sua vez, atuam como meio de dispersão de populações microbianas resistentes e favorecem a inserção de genes em bactérias naturais. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de três pontos de coleta no Rio Alegria, PR. Para análise microbiológica da água, utilizou-se a técnica do Número Mais Provável (NMP), com quantificação de coliformes termotolerantes, e posterior confirmação de *E. coli* em meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). O isolamento de cepas de *E. coli* deu-se em ágar nutriente para a obtenção de inóculo em água salina equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland. O antibiograma foi realizado seguindo-se a metodologia descrita no *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), com sete antimicrobianos: ciprofloxacina (5 mcg), norfloxacina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), nitrofurantoina (300 mcg), gentamicina (10 mcg), amicacina (30 mcg) e ceftriaxona (30 mcg), mediante o ensaio de disco-difusão em meio de cultura Ágar Mueller Hinton. Os halos de inibições foram medidos e classificados em sensíveis, intermediários ou resistentes de acordo com as tabelas fornecidas pelo BrCAST. E por último, foi realizado o cálculo do índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR). Foi possível constatar a presença de coliformes termotolerantes em todos os pontos de coleta, com maiores números de termotolerantes nos pontos 1 e 2, localizados na zona rural e centro da cidade, respectivamente. Realizado o teste de suscetibilidade, o ponto de coleta que mais apresentou isolados resistentes aos antimicrobianos foi o ponto 2 localizado na área urbana, seguido do ponto 1 e por último o ponto 3, demonstrando maior resistência aos antibióticos ampicilina, norfloxacina e ciprofloxacina. E por fim, calculado o índice MAR, os pontos 1 e 2 evidenciaram isolados com multirresistência, e de todos os isolados estudados nos três pontos, 17,4% demonstraram valores acima de 0,2. Nos pontos de coleta analisados, o Rio Alegria demonstra atuar como um ambiente seletivo para manutenção e propagação de genes de resistência em virtude do recebimento do esgoto sanitário, efluentes industriais e atividade agropecuária.

Palavras-chave: contaminação; antibióticos; coliformes; efluentes.

ABSTRACT

Water resources are recipient bodies of raw and treated effluents, which daily receive drugs and microorganisms that interact in the aquatic environment, such as *Escherichia coli* (*E. coli*), which is of fecal origin and often pathogenic. Through constant exposure to antimicrobials, many bacteria become resistant to antibiotics in these environments, which in turn act as a means of dispersing resistant microbial populations and favor the insertion of genes into natural bacteria. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from three collection points in Rio Alegria, PR. For microbiological analysis of the water, the Most Probable Number (MPN) technique was used, with quantification of thermotolerant coliforms, and subsequent confirmation of *E. coli* in Methylene Blue Eosin Agar (EMB) medium. *E. coli* strains were isolated on nutrient agar to obtain inoculum in saline water equivalent to a 0.5 tube on the McFarland scale. The antibiogram was performed following the methodology described in the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), with seven antimicrobials: ciprofloxacin (5 mcg), norfloxacin (10 mcg), ampicillin (10 mcg), nitrofurantoin (300 mcg), gentamicin (10 mcg), amikacin (30 mcg) and ceftriaxone (30 mcg), using the disk-diffusion assay in Mueller Hinton Agar culture medium. Inhibition halos were measured and classified as sensitive, intermediate or resistant according to the tables provided by BrCAST. And finally, the calculation of the multiple antimicrobial resistance index (MAR) was performed. It was possible to verify the presence of thermotolerant coliforms in all collection points, with greater numbers of thermotolerant ones in points 1 and 2, located in the rural area and downtown, respectively. After performing the susceptibility test, the collection point that most presented antimicrobial resistant isolates was point 2 located in the urban area, followed by point 1 and finally point 3, demonstrating greater resistance to the antibiotics ampicillin, norfloxacin and ciprofloxacin. And finally, after calculating the MAR index, points 1 and 2 showed multidrug resistance isolates, and of all the isolates studied in the three points, 17.4% showed values above 0.2. At the analyzed collection points, the Alegria River demonstrates to act as a selective environment for the maintenance and propagation of resistance genes due to the receipt of sanitary sewage, industrial effluents and agricultural activity.

Keywords: contamination; antibiotics; coliforms; effluents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Classes de antibióticos.....	14
Figura 1 - Representação da estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos	15
Figura 2 - Estrutura química da sulfadiazina e do sulfametoxazol	15
Figura 3 - Representação dos mecanismos de ação dos antimicrobianos na célula bacteriana	17
Figura 4 - Representação da estrutura química da tetraciclina	19
Figura 5 - Representação da estrutura da azitromicina (macrolídeos)	20
Figura 6 - Representação da modificação enzimática na amoxicilina pelo ser- β -lactamase (A) e metalo- β -lactamase (B).....	21
Figura 7 - Localização de Medianeira – PR	27
Figura 8 - Pontos de amostragem do Rio Alegria	28
Figura 9 - Esquematização dos procedimentos	31
Figura 10 - Halos de inibições do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	32
Figura 11 - Pontos de coleta de água	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de NMP de Coliformes Termotolerantes.....	34
Tabela 2 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 1	36
Tabela 3 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 2	38
Tabela 4 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 3	39
Tabela 5 - Índice de múltipla resistência a antimicrobianos	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Os antibióticos	13
3.1.1 Mecanismo de ação dos antibióticos.....	15
3.2 Desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos	17
3.2.1 Mecanismos de alteração da resposta antimicrobiana.....	19
3.3 Corpos hídricos como receptores de esgotos	21
3.3.1 Resistência bacteriana em ambientes aquáticos	23
3.3.2 A transferência de genes de resistência no esgoto.....	24
3.3.3 Coliformes termotolerantes como organismos indicadores.....	25
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	27
4.1 Caracterização da área e dos pontos de coleta	27
4.2 Coleta da água	29
4.3 Enumeração de coliformes termotolerantes	29
4.4 Antibiograma	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Caracterização dos pontos de coleta e enumeração de coliformes termotolerantes	33
5.2 Antibiograma	36
5.3 Índice MAR	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Atividades antrópicas aliadas ao crescimento populacional desenfreado contribuem para o aumento do uso dos recursos naturais, principalmente a água, cuja presença é essencial para a manutenção da vida. Tais atividades são, normalmente, responsáveis pela contaminação e poluição dos recursos hídricos.

Segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2021), 55,81% da população brasileira é atendida com esgotamento sanitário e 84,20% dos brasileiros tem acesso à água potável. Essa carência no tratamento de esgoto, afeta a biota aquática, degrada os recursos hídricos, além de contribuir para a transmissão de doenças de veiculação hídrica.

Diariamente, os mananciais superficiais que atuam como corpos receptores tem sua água contaminada pelo lançamento indevido de efluentes domésticos (MARTINS; ROCHA; SANTANA, 2018) e despejos dos resíduos industriais, que acabam contaminando também a água subterrânea devido à infiltração no solo (TUCCI, 2008).

Outro contaminante que acaba chamando bastante atenção, são os efluentes hospitalares, que servem como meio para a disseminação de microrganismos patogênicos, por possuírem uma carga grande de patógenos e fármacos, que foram evacuados pelos pacientes (VECCHIA *et al.*, 2009).

A água, portanto, pode atuar como veículo transmissor de patologias quando em contato com microrganismos patogênicos, tais como alguns gêneros bacterianos dentro do grupo dos coliformes, considerados indicadores da qualidade microbiana das águas. Dentre as bactérias que se destacam está a *Escherichia coli*, presente nas fezes de animais e de seres humanos. Esse microrganismo é utilizado como indicador de qualidade sanitária da água, devido ser viável, fácil de identificar e estar diretamente relacionado com as contaminações fecais (FUNASA, 2013). Logo, esta bactéria está associada a doenças do trato intestinal, que podem causar uma diarreia aguda, infecções do trato urinário, bacteremia e meningite (PERES, 2011).

Além da contaminação microbiológica, as águas superficiais estão sendo afetadas pelos poluentes emergentes. Esses poluentes não estão incluídos em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente e saúde, e tampouco estão inseridos em normativas ou legislações de controle ambiental. Trata-

se da presença de antibióticos no corpo hídrico que ocorre devido ao mau uso destes medicamentos nas condutas médicas, veterinárias e agrárias (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

No decorrer da pandemia COVID-19, houve um uso intensivo de antibióticos (MESQUITA *et al.*, 2022). Há estudos que afirmam que eles foram prescritos em 59% dos casos de internação por COVID-19, independentemente da presença de infecção bacteriana. Sabendo da capacidade de adaptação e produção de mecanismos de resistência, os profissionais de saúde se preocupam quanto ao aumento da crise sanitária relacionada às bactérias resistentes (MIRANDA *et al.*, 2020).

Nesta percepção, o Rio Alegria atua como fonte de abastecimento e corpo receptor de esgoto bruto e tratado do município de Medianeira – PR. Este rio se caracteriza como um dos imprescindíveis mananciais do município, porém, em relação ao saneamento básico, a estimativa é que somente 43,4% do município recebe tratamento de esgoto (SNIS, 2020). Com a preocupação da resistência antimicrobiana, tem-se como propósito a garantia da qualidade dessa água para a população, pois, sabe-se que se a água não tiver um tratamento adequado, pode transportar alguns microrganismos transmissores de doenças, por isso deve-se ter um acompanhamento de controle desse meio (PRESTES *et al.*, 2011).

Dessa maneira, faz-se necessário estudos que investiguem a resistência à antimicrobianos em ecossistemas naturais a fim de se apontar reservatórios ambientais dessa resistência bacteriana e contribuir com o planejamento de medidas que visem melhorar a qualidade microbiológica dos mananciais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de diferentes pontos de coleta no Rio Alegria, Medianeira, PR.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar pela técnica NMP coliformes termotolerantes em água coletada em diferentes pontos do Rio Alegria;
- Isolar cepas de *Escherichia coli* da água do Rio Alegria;
- Avaliar a resistência dos isolados de *Escherichia coli* a sete tipos de antibióticos, sendo eles: Ciprofloxacina (5 mcg), Norfloxacina (10 mcg), Ampicilina (10 mcg), Nitrofurantoina (300 mcg), Gentamicina (10 mcg), Amicacina (30 mcg) e Ceftriaxona (30 mcg);
- Calcular o índice de múltipla resistência a antibióticos dos isolados testados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os antibióticos

Os antibióticos são medicamentos produzidos a partir de uma substância natural ou criada sinteticamente, sendo capazes de impedir a multiplicação (bacteriostáticos) ou provocar a morte de bactérias (bactericidas) (WALSH, 2003).

A descoberta dos antibióticos ocorreu de modo acidental em 1928 por Alexander Fleming, que realizava experimentos com a bactéria *Estafilococos*. Durante as análises, o cientista observou crescimento de um fungo próximo às colônias bacterianas, e que próximo a esse fungo (*Penicillium notatum*) não havia atividade bacteriana. Reações inibitórias similares entre colônias em meio sólido são comumente observadas em microbiologia e são chamadas de antibiose. Foi daí que surgiu o termo antibiótico (FILHO, 2021).

Ainda segundo Filho (2021), dez anos após as observações de Fleming, Ernst Chain, juntamente com seu professor Howard Florey, estudando a respeito da penicilina, começaram a fazer testes em ratos, descobriram que aqueles que estavam infectados (doentes), após receberem a penicilina, melhoravam, possibilitando o surgimento de um antibacteriano.

Desse modo, o surgimento do antibiótico, possibilitou salvar muitas vidas, de pessoas que morriam com infecções e até mesmo nas realizações cirúrgicas, diminuindo as complicações. Na sequência, foi possível desenvolver novos tipos de antibióticos, para tratar diferentes tipos de infecções. Essa conquista trouxe grande mudança na medicina, visto que os hospitais que antes só buscavam melhorar os sintomas dos pacientes, conseguiam finalmente tratar a causa, eliminando o problema (BELL, 2019).

Os antibióticos podem ter diversas atuações, sendo de espectro largo, na qual atingem uma quantidade maior de bactérias, como as gram-positivas e as gram-negativas, incluindo até as que são favoráveis para o nosso organismo. E os de espectro estreito, que atuam apenas nas gram-negativas ou somente nas gram-positivas, sendo mais seletivo. Na medicina, é mais conveniente a utilização dos antimicrobianos de espectro estreito, pois agem especificamente no micróbio e diminuem a capacidade de desenvolver bactérias resistentes (FERNANDES, 2017).

Dentro desta perspectiva, existem diversas classes de antibióticos, nos quais cada um representa uma determinada função. As principais classes estão listadas no quadro 1 a seguir:

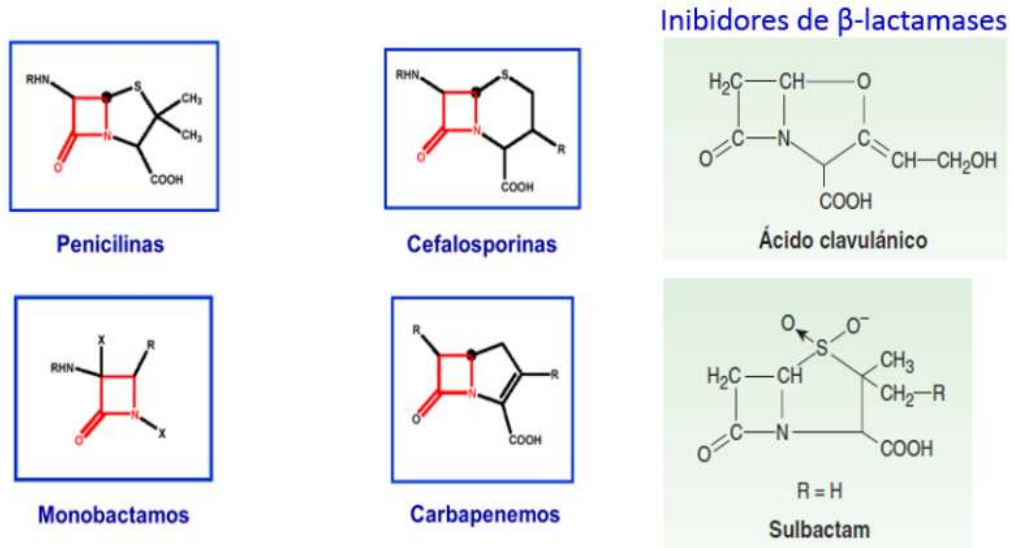
Quadro 1 - Classes de antibióticos

Classes	Exemplos
β -lactâmicos	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactams
Quinolonas	Ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina
Oxazolidinonas	Linezolida
Aminoglicosídeos	Estreptomicina, amicacina, gentamicina, tobramicina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina
Macrolídeos	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina
Lincosaminas	Clindamicina
Nitroimidazólicos	Metronidazol
Sulfonamidas	Sulfanilamida, sulfisoxazol, sulfacetamida, ácido para-aminobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol

Fonte: Adaptado. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007).

Os antibióticos β -lactâmicos, são uns dos mais utilizados na medicina, agindo sobre as gram-positivas e gram-negativas. Dentro deste grupo engloba-se as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactams e as inibidoras das β -lactamases, como ácido clavulânico e a sulbactam. Todos têm em comum o anel β -lactâmico, se distinguindo apenas nas cadeias laterais (BAPTISTA, 2013; GONÇALVES, 2019), como mostrado na figura 1.

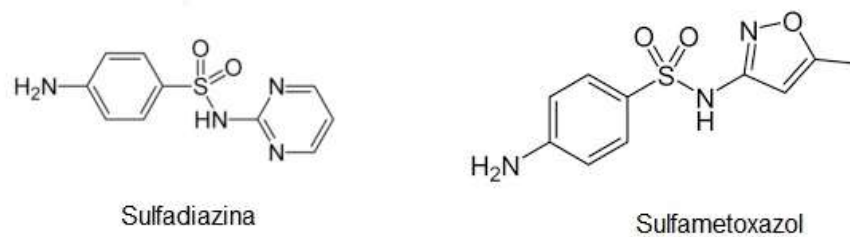
Figura 1 - Representação da estrutura química dos antibióticos β -lactâmicos



Fonte: Gonçalves (2019).

Outro grupo de antibiótico importante, é a sulfonamida, este foi um dos primeiros medicamentos para tratar infecções. São de largo espectro, e agem como bacteriostáticos (BAPTISTA, 2013). A figura 2 ilustra a estrutura química da Sulfadiazina e do Sulfametoxazol, exemplares de sulfonamidas.

Figura 2 - Estrutura química da sulfadiazina e do sulfametoxazol



Fonte: Adaptado. Wikipédia (2021).

3.1.1 Mecanismo de ação dos antibióticos

Os antibióticos podem se classificar de acordo com seu método de ação e por isso são colocados em cinco principais grupos:

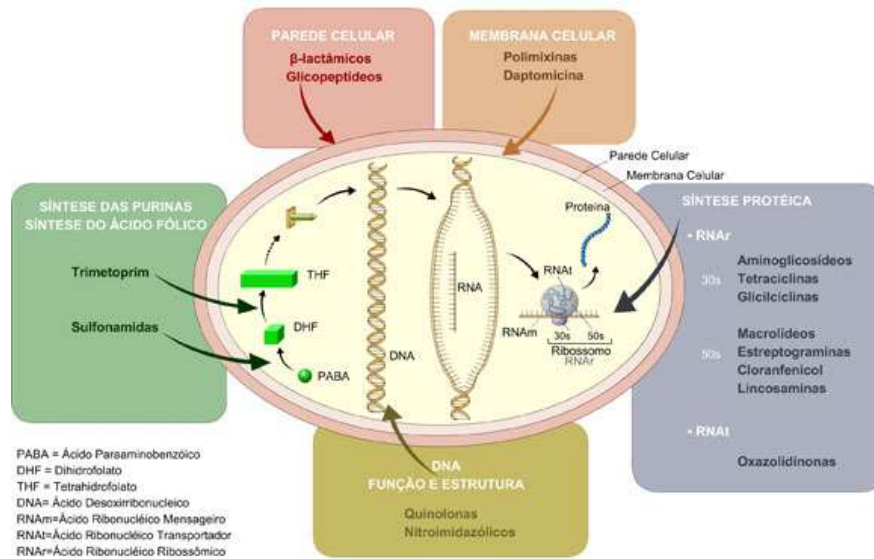
- Inibidores da síntese da parede celular: a parede celular é composta de peptidoglicano, logo ele impede a formação desse peptidoglicano deixando o vulnerável, provocando a ruptura desta parede, ocasionando a morte da célula

bacteriana. Como exemplo desse grupo tem-se as β – lactamas (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactâmicos) e os glicopeptídeos (vancomicina) que atuam inibindo a síntese da parede celular;

- Inibição da síntese proteica: a formação da síntese proteica é essencial para a célula, sendo realizada pelos ribossomos, estes possuem duas unidades 50S e 30S. Nesse caso os antimicrobianos vão atuar impossibilitando a formação desta síntese, para isto, se aderem em uma das unidades do ribossomo, se classificando em inibidores 50S (macrolídeos, cloranfenicol e oxazolidinonas) e 30S (tetraciclina e os aminoglicosídeos);
- Impedimento da transcrição e replicação do ácido nucleico: operam no DNA e RNA da célula, que são importantes para a multiplicação da bactéria, com isso acabam ocasionando a morte desta. Exemplos de antimicrobianos que atuam dessa maneira são as quinolonas, nitrofurantoína, ciprofloxacina e a rifampicina;
- Intervenção no metabolismo celular: atuam impedindo que os processos celulares ocorram, agindo como bacteriostáticos. É provocado pela sulfonamida e pelo trimetoprim, estes afetam o ácido fólico, paralisando sua produção e dificultando o crescimento e a proliferação da bactéria;
- Interação com a membrana celular: alguns antibióticos interagem com a membrana e acabam a tornando instável, gerando a lise celular e morte dessa célula, por exemplo as polimixinas, essas acabam afetando a membrana externa das bactérias gram-negativas, causando a permeabilidade e levando a lise (FERNANDES, 2017; TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019).

O esquema a seguir (figura 3), demonstra os respectivos mecanismos de ação:

Figura 3 - Representação dos mecanismos de ação dos antimicrobianos na célula bacteriana



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007).

3.2 Desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos

Quando os micróbios agem com um mecanismo de defesa contra os antibióticos, possuem genes que desativam o antimicrobiano, logo, o medicamento prescrito não fará mais efeito, criando a resistência (MACHADO, *et al.*, 2019). Com isso, cientistas vêm estudando diversas maneiras de combater essa tenacidade, criando novas formas de suprimir essas bactérias resistentes (KOCH *et al.*, 2021).

A resistência a antimicrobianos é uma das preocupações desse século, pois coloca em risco a saúde humana e animal. Sabendo que os microrganismos adquirem resistência de forma natural ao longo do tempo, isso já está sendo modificado e induzido, de maneira que essa resistência esteja crescendo aceleradamente. As razões pelas quais isso esteja acontecendo, se devem pelos seguintes fatores: uso indiscriminado de antibióticos, falta de prevenções e controle de infecções, baixa qualidade de antimicrobianos, falta de fiscalizações e normas de uso indiscriminado desses medicamentos (MS, 2019).

Além desses fatores já colocados, a World Health Organization (WHO, 2021), inclui que além do uso exacerbado de antimicrobianos, a carência no acesso de água potável, a falta de salubridade para os cidadãos e animais, a precariedade na obtenção de medicamentos, a falta de imunizações e diagnósticos de fácil acesso, escassez de tratamentos assépticos nas áreas de saúde e fazendas, são pontos que contribuem para a resistência. A WHO ainda destaca, a presença de patógenos

resistentes em humanos, animais, comidas, água, solo e ar, e ainda pode-se disseminar entre os seres humanos, e entre o indivíduo e o animal.

O desenvolvimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, também pode-se dar pelas seguintes causas:

- Resistência intrínseca, natural ou inerte: é uma resistência que ocorre de maneira natural, onde a própria bactéria produz essa resistência a um determinado fármaco, sendo uma herança genética, que passa de uma para outra sem sofrer alteração. Essas bactérias podem desativar a ação do medicamento, impossibilitando que consiga agir, como exemplo tem-se a penicilina. São capazes de invalidar o efeito do antimicrobiano, pelo fato da bactéria não ter parede celular e utilizar um medicamento que atua na síntese da parede celular. Por fim, podem também deteriorar o fármaco, como exemplo as β -lactamases.
- Resistência adquirida: a bactéria sofre uma mutação genética, e inibe o medicamento de agir, sendo assim se antes ela era sensível a esse antimicrobiano, agora ela se torna resistente.
- Resistência induzida: acontece quando a bactéria sofre uma lesão no seu material genético por agentes físicos, por exemplo, pelo raio X ou pelos raios ultravioletas (MACHADO *et al.*, 2019).

Além disso, tem-se a possibilidade de ocorrer a chamada transferência horizontal, esta se caracteriza pela obtenção de material genético vindo de outra bactéria, podendo ser de maneiras distintas, como por conjugação, transformação, transdução (BAPTISTA, 2013) e vesidução (SOLER e FORTERRE, 2020).

A transferência de genes resistentes por conjugação, acontece por meio de contato físico de uma bactéria que possui um material genético, com outra que não possui, havendo a transferência desse material. Diferentemente, a transformação ocorre quando uma bactéria sofre ruptura e exhibe seu material genético ao meio, com isso uma bactéria da mesma espécie, envolve esse material e insere no seu DNA. Já a transdução, se caracteriza quando um vírus ou bacteriófago, se instala na bactéria e transmite a ela o DNA que está transportando (MACHADO *et al.*, 2019). A vesidução por sua vez, é a transferência de DNA envolvendo vesículas extracelulares de uma célula doadora para uma receptora (SOLER e FORTERRE, 2020).

Observando essa problemática, a pandemia do novo Coronavírus (COVID-19), além das devastas consequências que gerou no mundo todo, também aumentou consideravelmente o uso indiscriminado de antibióticos, causando preocupações,

devido a ampliação dos índices de resistência microbiana. Desta forma, deve-se implementar um controle de uso de antibióticos nos hospitais, para conter o uso desenfreado deste fármaco (ANVISA, 2021).

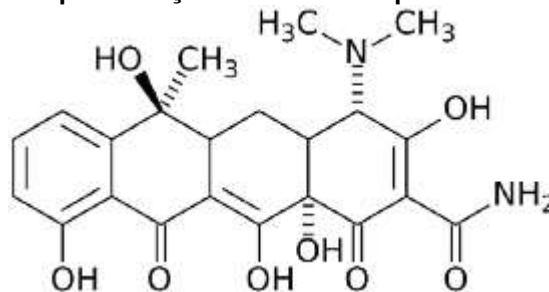
3.2.1 Mecanismos de alteração da resposta antimicrobiana

Os mecanismos de resistência envolvem os seguintes fatores, que estão descritos a seguir:

- Alteração de permeabilidade: a permeabilidade está relacionada com a entrada na célula bacteriana, na entrada dessa célula existem as chamadas porinas, que estão na membrana externa das bactérias gram-negativas, os antimicrobianos passam por essas porinas para adentrar na célula, porém, quando estas porinas sofrem alguma modificação, sua permeabilidade é atingida, e os antimicrobianos como os β -lactâmicos, não conseguem adentrar na célula, havendo resistência contra o medicamento (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; SAHA; SARKAR, 2021).

Como um dos exemplos nesse caso tem-se os aminoglicosídeos, estes podem penetrar tanto nas bactérias gram-negativas, como nas gram-positivas, essa alteração ocorre porque apresenta a carência no seu transporte com dependência de oxigênio. Sendo possível ser uma falha na ligação peptídica. No caso das tetraciclina, quando há alguma mudança nas porinas, não consegue alcançar o espaço periplasmático que se encontra nas gram-negativas (BAPTISTA, 2013). A figura 4 representa a estrutura da tetraciclina:

Figura 4 - Representação da estrutura química da tetraciclina



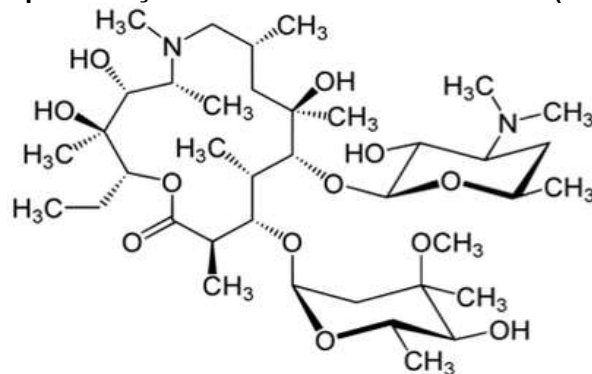
Fonte: Wikipédia (2021).

- Alteração no local de ação: a bactéria adquire resistência ao antimicrobiano, antes este conseguia adentrar e se fixar na célula, mas quando essa sofre uma mutação cromossômica, esse mesmo antibiótico não consegue mais se fixar nessa bactéria,

devido a alteração que ela sofreu, se tornando então resistente a esse fármaco (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; SAHA; SARKAR, 2021).

Essa alteração pode ocorrer na estrutura do peptidoglicano, em que há impedimento da atividade enzimática. Onde ocorre a resistência aos glicopeptídeos, como a vancomicina, devido a modificação no local de ação. Pode também haver a intervenção na síntese de proteínas, tendo resistência aos macrólídeos, aminoglicosídeos e tetraciclina. Outro fator que pode acontecer é a intercessão na síntese do DNA, como é o caso das fluoroquinolonas (BAPTISTA, 2013). A figura 5 representa a estrutura da azitromicina:

Figura 5 - Representação da estrutura da azitromicina (macrólídeos)



Fonte: Quinelato (2018).

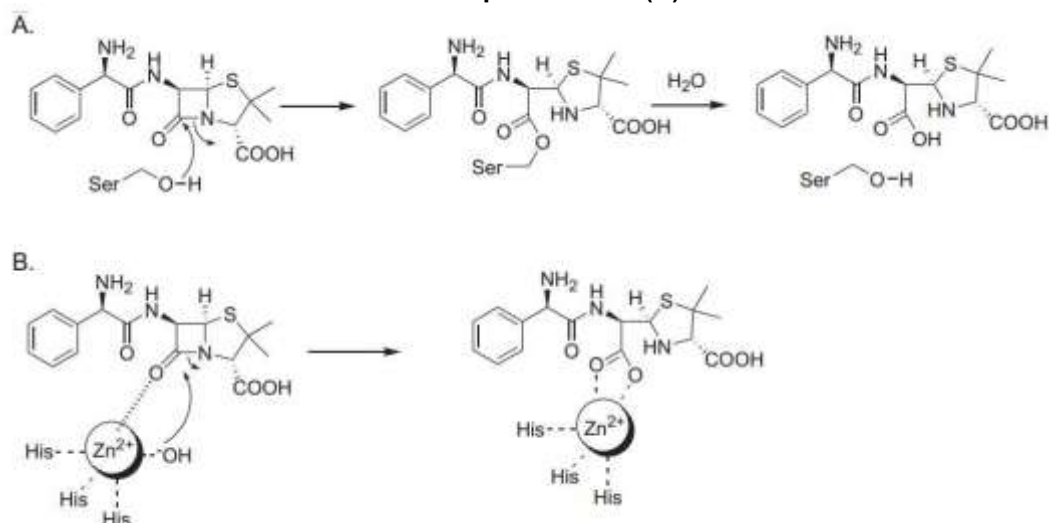
- Bombas de efluxo: essas bombas se concentram na membrana citoplasmática, quando um antimicrobiano adentra nessa membrana, rapidamente ele é expulso, não afetando sua estabilidade, com isso ela abrange diversos tipos de medicamentos, pois toda vez que é ameaçada ela expulsa antes que este atue (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; SAHA; SARKAR, 2021).

- Inativação enzimática do antibiótico: a bactéria produz enzimas que vão inativar o antibiótico, que vão degradá-lo, as principais enzimas são as β -lactamases, aminoglicosídeos e cloranfenicol, estas são capazes de bloquear o efeito do antimicrobiano (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; SAHA; SARKAR, 2021).

Para isso, pode ocorrer a hidrólise de antibióticos, como esses antimicrobianos possuem sensibilidade a ligações de amidas e ésteres, tornam-se mais influentes a sofrer essa hidrólise. Desse modo, a ruptura dessas ligações é realizada com base nessas enzimas. Um exemplo são as β -lactamases, nesse caso específico, há uma fragmentação na ligação do anel β -lactâmico das penicilinas e

cefalosporinas, devido estas enzimas necessitarem de água como co-substrato, por meio da ação do nucleófilo do grupo ser ou de um dependente de zinco, denominando metalo- β -lactamase, estimulado na presença da água, ocorre a quebra do anel β -lactâmico (BAPTISTA, 2013; WRIGHT, 2005), conforme a figura 6.

Figura 6 - Representação da modificação enzimática na amoxicilina pelo ser- β -lactamase (A) e metalo- β -lactamase (B)



Fonte: Wright (2005).

Há também outro modo que leva a inativação do antibiótico, através da transferência de grupos, que se deve por meio de enzimas que realizam a transferência de grupos funcionais, por exemplo o acetil, fosforil e adenilil, que dificultam a interação entre o antimicrobiano e o seu alvo (BAPTISTA, 2013). Por fim, tem-se a possibilidade de ocorrer o processo redox, em que há oxidação ou redução pela bactéria patogênica, porém esse caso é mais difícil de ocorrer (WRIGHT, 2005).

3.3 Corpos hídricos como receptores de esgotos

As águas superficiais se caracterizam por se encontrarem em superfícies e possuírem grandes volumes capazes de originar rios, lagos e riachos. Estas águas, após tratamento, são as principais fontes de água potável (VILLAR; GRANZIEIRA, 2019).

A água é de extrema importância para a vida humana, é um recurso indispensável utilizado para várias funções. Por isso, é de suma relevância que sua qualidade seja controlada e acompanhada pelas autoridades responsáveis, pois o

consumo de água de má qualidade pode gerar ameaça à saúde da população (CHO; JACKSON; FRYE, 2020).

A água ainda pode atuar como corpo receptor de esgoto bruto e tratado e, por meio disso recebe uma grande quantidade de contaminantes. No Brasil o deficiente acesso ao saneamento básico contribui para aumentar a contaminação do meio híbrido, por meio de despejos domésticos, resíduos industriais, hospitalares e ainda pelo meio de práticas agrícolas e pecuárias (CARTAXO *et al.*, 2020).

De acordo com o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS (2021), o Brasil dispõem de 60,24% de redes de esgoto da população total, considerando que desse esgoto total gerado 80,84% é tratado antes de ser despejado nos recursos hídricos. No estado do Paraná o esgoto coletado é de 75,31%, e destes, 99,86% são tratados. Em relação ao município de Medianeira, o índice do esgoto coletado é bem baixo, sendo de 43,4%, e o tratamento desse esgoto coletado é de 100% (SNIS, 2021).

Nos despejos de esgoto bruto e tratado encontra-se os chamados poluentes emergentes, podendo ser fármacos, cosméticos, produtos de limpeza, alimentos, embalagens e entre outros. Estes são descartados através de esgoto doméstico, com isso vão para os corpos hídricos e entram em contato com a água potável, contaminando esse meio. Um dos poluentes que se destaca é o antibiótico, que vem recebendo atenção pela preocupação da resistência antimicrobiana que se dissemina por esse ambiente. Há grande descarga desse fármaco não só pelos humanos, mas também por serem usados na pecuária, avicultura e na piscicultura (RICHARDSON; KIMURA, 2017). Além das maneiras citadas esses também podem ser expelidos na urina e pelas fezes dos indivíduos (ARSAND, 2019; RAGASSI, 2018).

Uma das principais preocupações são com os medicamentos de amplo espectro, quando estes se encontram no meio hídrico, podem promover uma alteração biológica nociva, criando resistências a outros medicamentos e alterando o material genético, causando mutações na sequência do DNA (CARTAXO *et al.*, 2020).

Além disso, sabe-se que os corpos hídricos transportam uma grande quantidade de carga microbiana, envolvendo cepas isoladas e também os microrganismos que se encontram no ecossistema (BRANCO; ALBERT; ROMÃO, 2021). Os coliformes sendo os totais ou termotolerantes, são patógenos presentes nesse meio, sendo em sua maioria relacionados ao trato intestinal. A presença de coliformes não significa exatamente a existência de doenças, mas indica o nível de

qualidade do recurso híbrido, como a presença de outros patógenos que são maléficos a saúde (LUZ *et al.*, 2020; FERREIRA, 2018).

3.3.1 Resistência bacteriana em ambientes aquáticos

Os ambientes aquáticos como águas subterrâneas, águas superficiais, lagoas, rios e mares, sofrem constantemente com a contaminação de antimicrobianos, sendo um dos principais meios de recepção dessa carga. A propagação por esse ambiente causa um transtorno ao ecossistema, afetando toda a biota aquática e contribuindo para a seleção de bactérias resistentes. As principais causas se relacionam com despejos de esgotos domésticos e hospitalares que, mesmo passando por um processo de tratamento, são ineficientes na remoção de fármacos (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017) e, em alguns casos ainda é possível verificar patógenos resistentes, até mesmo em água potável (NASCIMENTO, 2016).

Um mecanismo propício de disseminação de resistência bacteriana é através da pecuária. Neste caso específico utiliza-se antibióticos para tratar não somente doenças, mas também para os animais saudáveis, com o intuito de acelerar o processo de crescimento ou de ganho de peso. Esses antimicrobianos são metabolizados no organismo desses seres, e depois são liberados através da urina e das fezes, onde acontece a contaminação da água e do solo (RESENDE; SILVA; DINIZ, 2020).

Como já citado, as fontes de água potável não estão livres de contaminantes um exemplo disso são os chamados poços artesianos, caracterizados por possuir água própria para consumo, por ser de fonte subterrânea. Porém, dependendo de sua localização este se torna suscetível a apresentar resquícios de antibióticos e de resistência antimicrobiana, ocasionadas pelas fezes e urina de animais, aterros sanitários, escoamento de cano de esgoto danificado e de fissuras de fossas sépticas, que se dispersam no solo e contaminam esse ambiente (MANYI-LOH *et al.*, 2018).

Ainda segundo Manyi-Loh *et al.* (2018), as águas residuais não tratadas são outra fonte de dispersão de bactérias resistentes. Sabendo que estas águas podem ser utilizadas em fazendas de gados, aves e na agricultura para irrigação, e que elas contém uma grande carga de microrganismos, passam a funcionar como uma grande fonte de encontro de bactérias e de patógenos resistentes, e que mesmo sendo tratadas parcialmente ou totalmente, ainda corre o risco de se encontrar

contaminantes. Sendo assim, quando usadas para irrigação do plantio, funciona como uma porta de entrada de coliformes para o meio ambiente.

Para Santos e Ramos (2019), um ponto relevante, é o uso de antibióticos na aquicultura com fins profiláticos, que se deve a animais doentes, mas também aos saudáveis. Essa prática promove a prevenção de doenças a esses animais, mas como consequência, gera sérios problemas ao meio aquático e a saúde humana, devido a inserção de antibióticos.

Além dos pontos já citados, tem-se o descarte de antibióticos, que é um fator preponderante nesse meio. Já foram detectados diversos fármacos no ambiente aquático, tornando preocupante essa situação, visto que são capazes de alterar o ecossistema, trazendo a seleção e morte de microrganismos, sabendo que mesmo com o tratamento adequado ainda pode-se encontrar resquícios desses medicamentos nas águas (NASCIMENTO, 2016).

Na pesquisa realizada por Araújo (2019), verificaram a presença de resistência antimicrobiana em um dos principais cursos d'água de Porto Alegre, exibindo sete isolados que tiveram resistência a pelo menos um dos catorze antibióticos testados, e dois destes ainda mostraram multirresistência. Tendo essa resistência em sua maioria a classe dos β -lactâmicos.

Em outro estudo realizado por Vasconcelos (2010), em um açude localizado no Ceará, foi mostrado que 32,6% de cepas de *E. coli* apresentaram resistência a pelo menos um dos oitos antibióticos utilizados. Demonstrando um elevado grau de resistência, especialmente a tetraciclina. Desse modo, valida que os recursos hídricos são um dos principais meios para que ocorra a disseminação de bactérias resistentes.

3.3.2 A transferência de genes de resistência no esgoto

O esgoto é um ambiente favorável para a transferência de genes de resistência, pois encontra-se nele diversos nutrientes e matéria orgânica, que são benéficos para esses patógenos. O encontro de antibióticos presentes nesta rede contribui para a seleção dessa resistência, pois em contato com bactérias sensíveis, promove a eliminação dessas e aumenta a concentração de genes resistentes (DEPIZZOL, 2006).

O grande despejo de atividades hospitalares, urbanas e industriais, são exemplos de como ocorrem a presença de altos contaminantes nos esgotos,

encontrando a presença de diversos antimicrobianos. Com isso, através da transferência horizontal de genes, que é oportuno de ocorrer nesse ambiente, ocorre a substituição de componentes móveis de uma bactéria para a outra, promovendo a resistência (JOSEPH *et al.*, 2019).

Essa transferência de genes, tem como fonte de origem o plasmídeo, nele está concentrado um DNA extracromossomal, que se difere do DNA da bactéria, sendo assim capaz de adquirir informações de resistência que essa antes não possuía, sendo o responsável pela multiplicação e transferência de material genético para outras bactérias (AGUIAR, 2020).

As estações de tratamento de esgoto (ETE) aumentam a capacidade de ocorrer a transferência horizontal, por possuírem diversos microrganismos em seu meio, possibilitando a resistência a antimicrobianos (DEPIZZOL, 2006).

Estudos já comprovaram que mesmo após o tratamento para purificar o recurso hídrico, ainda é possível de se encontrar índices de coliformes, mesmo que pequenos (KARKMAN *et al.*, 2018).

Existem algumas alegações a respeito desses índices encontrados, a primeira é devido aos resíduos de medicamentos e outros elementos com potencial para influencia seletiva, que são despejados nas redes de esgoto. Outro fator é na fase de tratamento desse recurso, onde essa circunstância pode beneficiar para que haja a transferência horizontal e resistência antimicrobiana. E por último, destaca-se que no procedimento realizado para depurar a água, mesmo que seja excelente, ainda será possível encontrar patógenos resistentes, podendo ser suscetível para as chamadas bactérias incultiváveis (NOVO *et al.*, 2013).

3.3.3 Coliformes termotolerantes como organismos indicadores

Os coliformes termotolerantes são bactérias do mesmo grupo dos coliformes totais, e se caracterizam por realizarem a fermentação da lactose, em temperaturas de 44 – 45°C. Como destaque desse grupo tem-se a *Escherichia coli* (*E. coli*) de linhagem fecal (ALVES; ATAIDE; SILVA, 2018).

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa que habita no trato gastrointestinal, presente em seres humanos e nos animais de sangue quente. A *E. coli* é considerada como um indicador de infecção fecal para analisar a condição da água. Por esse motivo, um meio contaminado é ótimo para transportar essa bactéria.

A contaminação da água por *E. coli* é muito comum, já que é excretado pelos seres humanos e animais, pois quando é descarregada nos esgotos domésticos, muitas vezes esses não foram tratados suficientemente e são despejados nas águas superficiais contaminando esse meio (SILVA, 2021; CHO; JACKSON; FRYE, 2020).

Observando isso, a *E. coli* possui cepas patogênicas e não patogênicas, ou seja, podem ser inofensivas na maioria dos casos ou causarem algumas doenças, como infecção urinária, bacteremia e meningite. As classes que podem causar infecções intestinais são: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (RÍOS-TOBÓN; AGUDELO-CADAVID; GUTIÉRREZ-BUILES, 2017).

Logo, por conta da *E. coli* sempre se encontrar presente em ambientes de contaminação fecal, muito mais do que outros coliformes termotolerantes ou totais, se tornou mais viável utilizar esta para identificar a qualidade microbiológica da água, considerando que o monitoramento microbiano da qualidade da água é essencial, para não causar danos à saúde pública (ANDRADE; BARROS, 2019).

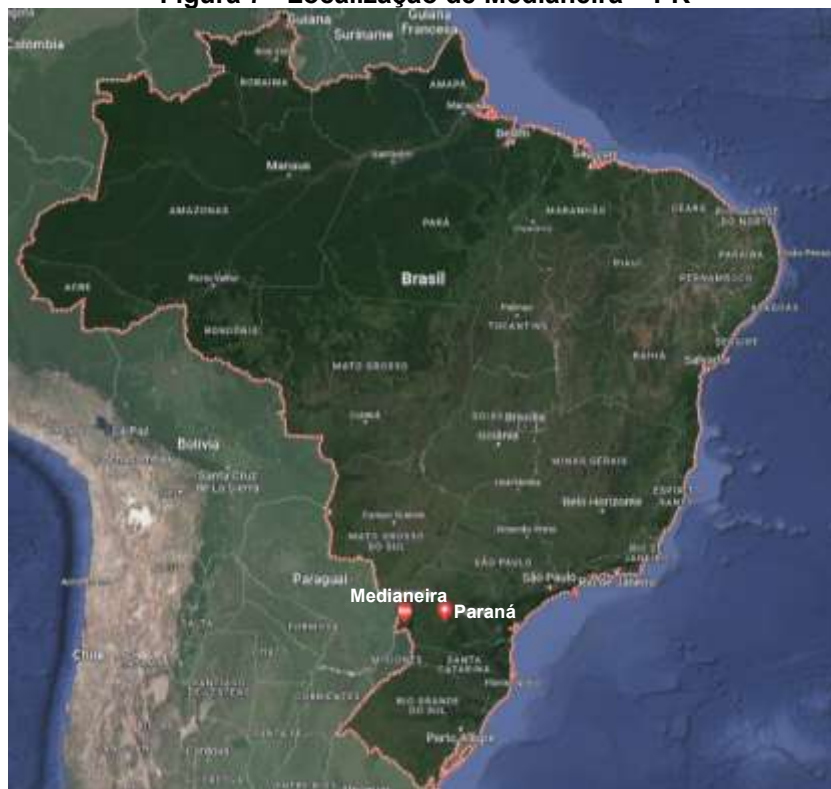
A *E. coli* é sempre identificada em análises ambientais e é específica para representação de contaminante fecal. A realização de ensaios de resistência antimicrobiana com organismos que apresentam esta característica pode indicar o grau de alteração dos ecossistemas pela ação humana, além de servirem de reservatórios para genes de resistência e para outros microrganismos (DEPIZZOL, 2006).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Caracterização da área e dos pontos de coleta

A pesquisa foi realizada no município de Medianeira, localizado no oeste do Paraná, na coordenada geográfica: latitude sul 25°17'40" S e longitude 54°05'30" W-GR, Brasil. O clima deste município é caracterizado como subtropical úmido mesotérmico, não possuindo estação de seca definida, mas conta com verões quentes, sendo superior a 24°C e invernos com médias de 17°C. As geadas não são comuns mas podem ocorrer em invernos mais extremos (PMSB, 2018). Na figura 7 encontra-se o mapa com a localização da respectiva cidade.

Figura 7 - Localização de Medianeira – PR



Fonte: Google Maps (2023).

O rio Alegria que tem suas nascentes localizadas na área rural do município de Medianeira, recebe água de alguns afluentes, tais como a Sanga Magnólia, Sanga Maduri e Sanga Maguari e, é um dos tributários do rio Ocoy, que tem sua foz no Reservatório de Itaipu (ANZOLIN, 2013).

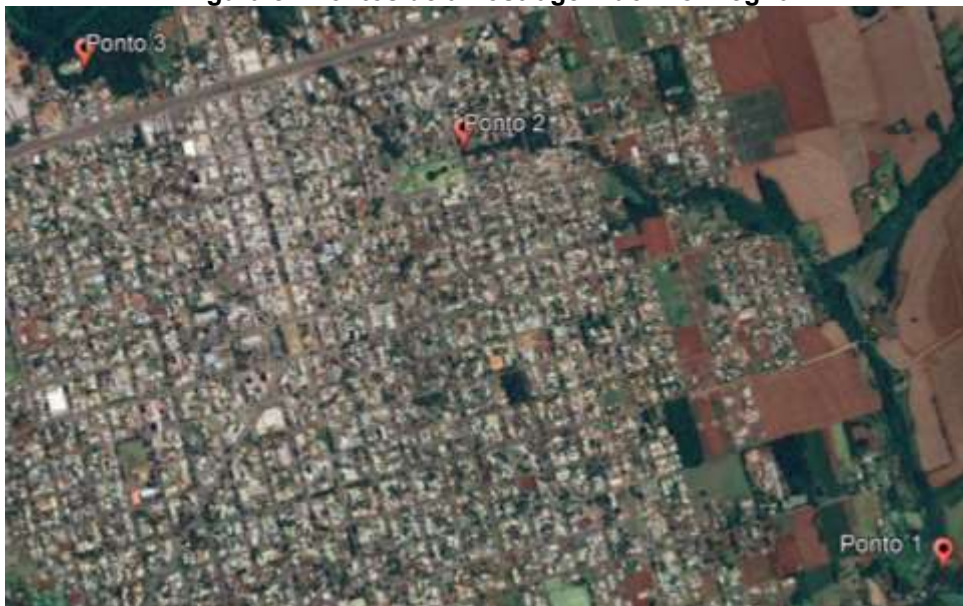
O rio Alegria corresponde um dos principais mananciais do município e também um dos principais afluentes que abastecem os arredores e o centro da cidade

de Medianeira, disponibilizando água para a utilização na área urbana, rural e industrial. É utilizado principalmente pela Sanepar (Companhia de Saneamento do Paraná), para realizar a captação de água para o abastecimento municipal (ANZOLIN, 2013).

Sua nascente é localizada na zona rural e possui aproximadamente 28 km de extensão, percorrendo dentro da cidade 7,3 km (PMSB, 2018) cujo trecho é classificado como Classe 3 com base nos usos para rios da Bacia do Paraná-III, da qual o rio Alegria faz parte (CONAMA, 2005).

Neste rio, foram definidos três pontos de coleta de água, com particularidades distintas. O ponto 1 (latitude 25° 18'10.5" Sul e longitude 54° 04'14.3" Oeste) localiza-se na região de área rural, a fim de averiguar se há diferença nos níveis de contaminação entre o perímetro rural e urbano do rio (Figura 8).

Figura 8 - Pontos de amostragem do Rio Alegria



Fonte: Google Earth Pro (2022)

Os outros dois pontos localizam-se ao longo do perímetro urbano. O ponto 2 (latitude 25° 17'21.6" Sul e longitude 54° 05'14.2" Oeste), está situado no centro da cidade (figura 8), sendo uma região em que ocorre despejos de efluentes diretamente no rio, principalmente por apresentar diversas residências ao seu entorno e não tendo presença de mata ciliar, contribuindo para que haja essa contaminação.

O ponto 3 (latitude 25° 17'12" Sul e longitude 54° 06'3.4" Oeste) está localizado numa região próxima à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), para

que assim possa ser analisado o grau dessa contaminação, já que é um local que reúne muitos microrganismos.

4.2 Coleta da água

As coletas da água foram feitas nos meses de junho, setembro e dezembro de 2022, totalizando três coletas. Em cada ponto foram coletadas três amostras de 100mL em recipientes de vidros (devidamente esterilizados), a 20 cm de profundidade.

Os recipientes em que estavam acondicionadas as amostras foram colocados em uma caixa térmica com gelo, até serem deslocados para o laboratório de microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Medianeira onde foi realizado imediatamente as análises (BRASIL, 2013).

4.3 Enumeração de coliformes termotolerantes

Para quantificação de coliformes totais e termotolerantes empregou-se a técnica do número mais provável (NMP/g) ou técnica dos tubos múltiplos conforme *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2017).

Para a etapa denominada Etapa Presuntiva foram preparados três séries de cinco tubos (15 tubos no total) contendo 9mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Foram pipetados os volumes de 10mL, 1mL e 0,1mL de água de cada ponto de coleta em cada uma das três séries de tubos com posterior incubação em estufa bacteriológica a 35°C por até 48h.

Transcorrido o período de incubação, foi analisado cada tubo individualmente, sendo separados aqueles com evidência de fermentação (tubos contendo gás no tubo de Durham e turvação do meio), considerados tubos positivos.

A confirmação de Coliformes Termotolerantes aconteceu mediante o preparo de tubos contendo 10mL de caldo *Escherichia coli* (EC). Os tubos positivos do caldo LST foram repicados para o caldo EC (o número de tubos positivos da etapa presuntiva deve ser o número na etapa confirmativa). Em sequência, levou-se os tubos para a incubadora por 24/48h a 45°C.

Os tubos positivos (presença de gás no tubo de Durham) foram considerados para obtenção do número mais provável (NMP) de coliformes por mL, utilizando-se a tabela do NMP.

Para comprovar a existência de *E. coli*, utilizou-se a técnica de esgotamento em estrias utilizando a alça de platina, para obtenção de colônias isoladas. Desse modo, uma amostra de cada tubo EC foi transferida para placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), capaz de distinguir a *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes, sabendo que estas bactérias apresentam colônias verdes fluorescentes em meio de cultura EMB. Estas análises foram realizadas em duplicatas e as placas incubadas a 35 °C por 24 horas.

4.4 Antibiograma

O antibiograma é uma análise que opera com o intuito de determinar o perfil de sensibilidade e resistência de bactérias e fungos aos antibióticos. Este foi realizado após a identificação e isolamento da *E. coli* em cada um dos pontos de coleta de água. Foram utilizados sete antibióticos: Ciprofloxacina (5 mcg), Norfloxacin (10 mcg), Ampicilina (10 mcg), Nitrofurantoina (300 mcg), Gentamicina (10 mcg), Amicacina (30 mcg) e Ceftriaxona (30 mcg), através da técnica do disco-difusão (Kirby e Bauer, 1966) em meio de cultura Ágar Mueller Hinton. A metodologia utilizada foi a *do Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2017)*.

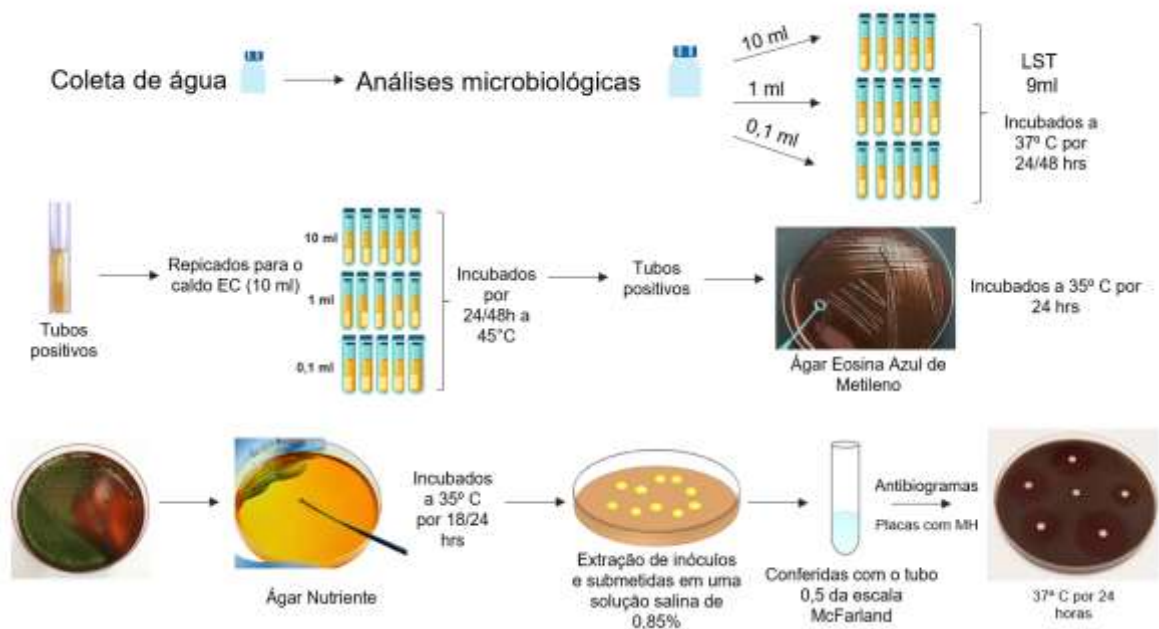
Conforme descrito pelo BrCAST (2017), a preparação de inóculos deve ser realizada por meio do crescimento *overnight* em ambientes não seletivos, utilizando várias colônias morfológicamente semelhantes (quando possível), para evitar a seleção de variantes extremas e suspender as colônias em solução salina com uma alça estéril ou cotonete.

Com base nisto, após as colônias crescidas no ágar nutriente por 24h realizou-se a extração de inóculos das amostras, e submeteu-se em uma solução salina de 0,85% no volume de 10 mL, até apresentar uma turvação que conferia com o tubo 0,5 da escala McFarland e seguidamente verificada a olho nu.

Realizada a suspensão bacteriana, estas eram transferidas para placas com ágar *Mueller Hilton*, mergulhando um swab estéril nesta solução e espalhando uniformemente sobre toda a placa, deixando-a descansar por alguns minutos para que ocorresse a absorção dessa amostra.

Após este tempo, com os discos de antibióticos estando em temperatura ambiente, estes eram colocados firmemente sobre a superfície da placa (não ultrapassando o tempo de 15 minutos da inoculação) com o auxílio de uma pinça esterilizada, para que assim houvesse o crescimento do halo de inibição. Vale ressaltar, que depois de depositado os discos, estes não podiam ser removidos, devido a rápida difusão dos agentes antimicrobianos (BrCAST, 2017). Estas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. A figura 9, demonstra a esquematização desses procedimentos.

Figura 9 - Esquematização dos procedimentos

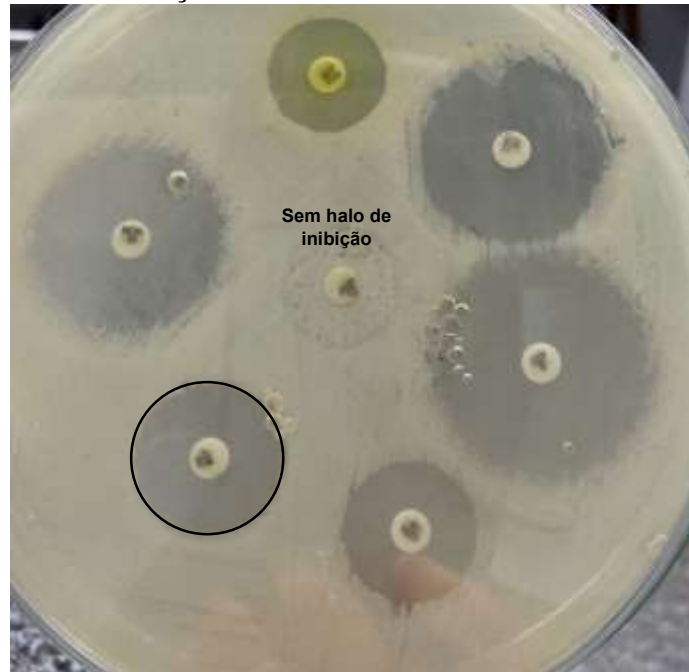


Fonte: Autoria própria (2022)

Ao término deste período foram determinados os diâmetros de inibição do crescimento microbiano com régua, realizando-se duas medidas por halo, interpretando conforme a zona de inibição (mm) (de acordo com a figura 10), e posteriormente efetuado a média aritmética desses valores. Desse modo, com as medidas aferidas foi possível classificar os isolados em sensíveis, intermediárias ou resistentes, utilizando as medidas definidas pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST).

Com os dados obtidos no experimento, fez-se uma comparação e interpretação dos diâmetros dos halos de acordo com os valores de corte contidos nas tabelas fornecidas pelo BrCAST (VASCONCELOS *et al.*, 2010).

Figura 10 - Halos de inibições do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos



Fonte: Autoria própria (2022)

O índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) foi calculado conforme a metodologia descrita por Krumperman (1983), definido pela relação entre o número de antibióticos em que a amostra é resistente e o número total de fármacos testados. Calculado o índice MAR, aqueles que apontaram acima de 0,2 representaram multirresistência. Os dados obtidos foram tabulados e examinados, conforme será apresentado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos pontos de coleta e enumeração de coliformes termotolerantes

Na figura 11 é possível observar os pontos de coleta de água que foram utilizados no desenvolvimento da pesquisa.

Figura 11 - Pontos de coleta de água



Fonte: Autoria própria (2022)

O primeiro ponto está localizado na zona rural da cidade e possui em seu entorno algumas casas e atividades agrícolas e pecuárias, apresentando também uma estreita mata ciliar. O ponto 2, está localizado na região central da cidade, por este motivo possui muitas residências ao seu redor, contribuindo para o despejamento de esgotos domésticos diretamente no rio, além disso não tem presença de mata ciliar. Já o terceiro ponto, conta com restrita mata ciliar e se encontra antes da estação de tratamento de efluentes da cidade.

A tabela 1 apresenta os resultados para coliformes termotolerantes na água coletada dos três pontos do Rio Alegria, e por meio dela, identifica-se o NMP de

microrganismos que estão presentes na amostra e estima-se a população bacteriana estatisticamente por meio do limite de confiabilidade (95%).

Tabela 1 - Índice de NMP de Coliformes Termotolerantes

	1º Coleta Jun/2022		2º Coleta Set/2022		3º Coleta Dez/2022	
Pontos de coletas	Limite 95% Inferior - Superior	Índice de NMP/100mL	Limite 95% Inferior - Superior	Índice de NMP/100mL	Limite 95% Inferior - Superior	Índice de NMP/100mL
Ponto 1	400 - 4600	1.600	0,79 – 15	4,5	150 – 1.700	540
Ponto 2	700 - ...	>1.600	0,1 - 10	2	220 – 2.600	920
Ponto 3	700 - ...	>1.600	6,8 - 70	23	3,4 – 22	9,2

...: limite não identificado

Fonte: Autoria própria (2023)

Observa-se que na primeira e terceira coleta, o índice de NMP/100mL para coliformes termotolerantes são bem distintos da segunda coleta, tendo valores bem superiores. Mas também pode-se analisar a presença destes coliformes em todos os pontos.

O Plano da Bacia do Paraná III define o Rio Alegria como classe 3, quando este percorre dentro das coordenadas (7198078,6964 m S 190792,870899 m E, até a as coordenadas 7199742,2776 m S, 187661,212899 m E), com essa condição acaba enquadrando os pontos 2 e 3 nessa classe. Segundo a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357/2005, Art. 4º, os rios de classe 3 podem ser destinados ao consumo humano (após tratamento adequado), a pesca amadora, a contato esporádico e para saciar a sede de animais, são alguns dos pontos atribuídos a esta classe de rios.

Ainda segundo a Resolução do CONAMA 357/2005, complementada com a resolução 430/2011, destaca que não se deve ultrapassar o valor de 2.500 coliformes termotolerantes por 100 mL de água em 80% das amostras coletas, para o uso de recreação e de contato secundário. Para demais usos é estabelecido o limite de 4000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% das amostras.

Observando que não se deve ultrapassar o limite de 2500 coliformes termotolerantes, percebe-se que essa margem foi excedida nos pontos 2 e 3 que se enquadram nesta classe, pois demonstram na primeira coleta valor superior a 1.600,

não atendendo as normas do CONAMA. Estes pontos estão localizados na área urbana, desse modo, recebem contaminação de lixos e esgotos domésticos sem tratamento, contribuindo para que haja a presença de coliformes termotolerantes.

Já para o ponto 1, o Plano da Bacia do Paraná III enquadra esse ponto na classe 2 por se encontrar em zona rural e, para este, a Resolução CONAMA 357/2005 permite a utilização dessa água para abastecimento humano (após o tratamento convencional), contato para mergulhos, irrigação de verduras, legumes, jardins e para várias outras atividades.

Esta Resolução também estabelece as seguintes condições para coliformes termotolerantes na seção II, Art.15: “Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral” (CONAMA, 2005, p.14).

Com base nesta informação, o ponto 1 apresentou para a primeira coleta uma quantidade de coliformes termotolerantes que ultrapassa o valor permitido. Como é um ponto localizado na área rural, a presença de contaminação fecal pode ser explicada pela criação de animais nessa região, cujos dejetos alcançam as águas do rio através do escoamento superficial da água da chuva.

Cabral (2010) cita que uma importante fonte de contaminação das águas superficiais são as águas de drenagem oriundas de áreas agrícolas, pastagens e áreas urbanas. Além disso, pode-se analisar que nos pontos 1 e 2 haja provável contaminação de esgotos domésticos, devido aos altos índices de coliformes constatados, confirmando também a presença de fezes de animais de sangue quente. Nota-se que ao longo do trecho do P1 para o P2, essa contaminação vai aumentando, principalmente pelo segundo ponto estar localizado na parte central da cidade.

Na pesquisa realizada por Prestes *et al.*, (2011), ao avaliarem a qualidade das águas do rio Alegria e Bolinha, constataram a presença de coliformes totais em todas as amostras, e de coliformes termotolerantes em sete dos oito pontos de coleta.

Comportamento semelhante em águas superficiais também foi apresentado no trabalho de Vasconcellos, Iganci e Ribeiro (2006), ao examinarem o rio São Lourenço no Rio Grande do Sul, estes exibiram que das amostras analisadas 93% obtiveram resultado positivo para coliformes totais e termotolerantes, e não atenderam as normas do CONAMA, tendo valores superiores do permitido. Além disso,

enfatazaram que as coletas realizadas durante o inverno foram as que mais evidenciaram um aumento dessa contaminação.

Como não atendeu à legislação na maioria das situações, a *Escherichia coli* foi isolada em todos os pontos de coleta. No ponto 1, foram isoladas 10 cepas (tabela 2), enquanto que no ponto 2 e 3 foram isoladas, 7 e 6 (tabelas 3 e 4) cepas respectivamente. Ressalta-se, portanto, que a água do Rio Alegria deve ser submetida à tratamento adequado uma vez que apresenta microrganismos potencialmente patogênicos e capazes de causar doenças ao homem.

5.2 Antibiograma

Os resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos são evidenciados nas tabelas 2, 3 e 4. A tabela 2, demonstra o perfil de resistência dos isolados de *E.coli* no ponto 1.

Tabela 2 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 1

Antibióticos		Coleta 1				Coleta 2	Coleta 3				
		A	B	C	D		E	F	G	H	I
CIP 5	Ciprofloxacina	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
NOR 10	Norfloxacina	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S
AMP 10	Ampicilina	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
NIT 300	Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GEN 10	Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMI 30	Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CRO 30	Ceftriaxona	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S

S: Sensível, R: Resistente; A, B, C, D, E, F, G, H, I, J: isolados de *E.coli*

Fonte: Autoria própria (2023)

Ao observar a tabela percebe-se que houve um percentual considerável de isolados resistentes, no qual dos dez isolados apresentados, 60% destes exibiram algum tipo de resistência a determinado fármaco. Esse número torna-se preocupante, por este local se encontrar em área rural.

Neste trabalho, foram isoladas quatro cepas de *E. coli* na primeira coleta e destas 75% apresentaram resistência aos antibióticos ciprofloxacina, norfloxacina,

ampicilina e ceftriaxona. Na segunda coleta, a única cepa isolada demonstrou resistência somente a ceftriaxona. Já na terceira coleta, das cinco cepas apenas duas apresentaram resistência, sendo ambas ao antimicrobiano norfloxacin.

As áreas rurais do município de Medianeira, contam com a criação de animais, como rebanhos bovinos, equinos, suínos, galináceos, ovinos e vacas ordenhadas (IPARDES, 2023), assim como também com fossas rudimentares. Logo, os dejetos desses animais e dos seres humanos, acabam contaminando o solo e o lençol freático, influenciando na contaminação desse manancial (PMSB, 2018), uma vez que além dos dejetos, muitos antibióticos também são eliminados.

Com isto, vale destacar que a grande maioria dessas classes de antibióticos são também usados em animais. Esse uso, sendo ele com fins profiláticos ou terapêuticos (GUARDABASSI; KRUSE, 2018), contribuem para que ocasione esse aumento da resistência, já que estes medicamentos são eliminados por meio das fezes desses animais.

Dessa forma, percebe-se que a área rural exibe uma forte presença de atividade agropecuária em seu entorno, o que acaba favorecendo na presença de bactérias nesse meio, justificando os índices de resistência nesta região.

Em um estudo realizado na zona rural de Santa Rita na Paraíba, avaliaram a qualidade da água que abastece essa região, neste, confirmaram a presença de coliformes totais e *E.coli* em 80% dos pontos analisados, e que somente 20% apresentaram ausência, não atendendo as normas de padrão microbiológico determinadas pela legislação. Essa contaminação foi explicada, pelas práticas que são desenvolvidas ao redor desse efluente, como atividades agrícolas e a falta de saneamento rural (SILVA, 2019).

Menezes *et al.* (2012) complementam que as águas superficiais vêm sendo deterioradas, tanto em bacias hidrográficas rurais como urbanas ainda devido ao uso e ocupações inadequadas da terra, desmatamentos e emissão de poluentes nos corpos d'água.

Em seguida, tem-se a tabela 3 com os resultados de resistência antimicrobiana para o ponto de coleta 2, que está localizado na região central da cidade de Medianeira.

Tabela 3 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 2

Antibióticos		Coleta 1				Coleta 2	Coleta 3		
		K	L	M	N		O	P	Q
<i>CIP 5</i>	Ciprofloxacina	R	I	S	S	-	R	R	S
<i>NOR 10</i>	Norfloxacina	S	S	S	S	-	R	R	S
<i>AMP 10</i>	Ampicilina	S	S	S	S	-	R	R	S
<i>NIT 300</i>	Nitrofurantoina	S	S	S	S	-	R	S	S
<i>GEN 10</i>	Gentamicina	S	R	S	S	-	R	S	S
<i>AMI 30</i>	Amicacina	S	S	S	S	-	S	S	S
<i>CRO 30</i>	Ceftriaxona	S	S	S	S	-	R	S	S

S: Sensível, R: Resistente, I: Intermediário; K, L, M, N, O, P, Q: isolados de *E.coli*; -: não houve confirmação de *E.coli*.

Fonte: Autoria própria (2023)

Analisando a tabela, nota-se que dos quatro isolados na primeira coleta, dois deles (isolados K e L) possuem resistência há pelo menos um dos sete antimicrobianos utilizados. E dos três isolados de *E.coli* na terceira coleta, 67% apresentaram resistência. Nesta coleta, vale enfatizar que o isolado O, foi o que maior apresentou resistência (85,7%), a praticamente todos os fármacos com exceção de um. Este isolado que chamou bastante atenção por apresentar maior resistência do que sensibilidade, indica que ele consegue resistir as ações de diversos antibióticos.

Silva (2016), explica que quando um isolado apresenta multirresistência, pode estar associado a vários mecanismos de resistências diferentes, oportunizando a propagação de doenças e a contaminação em diversos ambientes.

Pode-se dar atenção também ao isolado P, que apresentou 42,8% de resistência. E ao isolado L, que demonstrou resistência apenas ao fármaco gentamicina e também se mostrou intermediário a ciprofloxacina. O intermediário demonstra que houve halo de inibição, mas não o suficiente para combater o antimicrobiano. Vale ressaltar, que este ponto de coleta foi o que retratou maior resistência aos antibióticos utilizados.

Os altos índices de resistência (R) apresentados se devem a localização desse ponto, que não possui mata ciliar e inclui muitas residências ao seu entorno, sendo contaminado por depósitos de lixo e lançamentos de efluentes domésticos sem tratamento diretamente no corpo hídrico, sem coleta ou tratamento (FLECK, *et al.*, 2012).

Logo, pode-se observar que a ausência de coleta e de tratamento de esgoto nesse ponto, vem contribuindo para que haja essa grande contaminação de coliformes na água, como também de substâncias químicas, devido ao uso inadequado de antibióticos utilizados pela população, que acabam favorecendo a resistência. Desse modo, este ponto acaba cooperando para a disseminação de bactérias com possível caráter patogênico.

Uma das observações dessa tabela, é que na coleta 2 não houve nenhuma confirmação de *E.coli*.

No ponto 2, dos sete isolados apresentados 42,8% apresentaram resistência a ciprofloxacina, 28,5% a norfloxacina, ampicilina e gentamicina, 14,3% a nitrofurantoina e ceftriaxona. O único antibiótico que se mostrou eficiente a todos os isolados avaliados foi a amicacina.

A amicacina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, geralmente indicados para tratar infecções ocasionadas por bactérias gram-negativas. Dentro das células estes se aderem aos ribossomos para que sejam capazes de inibirem a síntese proteica. Este procedimento acarreta em um aumento de permeabilidade da membrana, proporcionando uma maior absorção desse fármaco. Diante disso, são chamados de agentes bactericidas, já que sua ação é exercida nos ribossomos e nas membranas celulares bacterianas (FERNANDES, 2017).

Por conseguinte, tem-se a tabela 4 que mostra os resultados obtidos para o perfil de resistência dos 6 isolados de *E.coli* obtidos no ponto 3.

Tabela 4 - Perfil de resistência antimicrobiana no Ponto 3

Antibióticos		Coleta 1		Coleta 2			Coleta 3
		T	U	V	W	X	Y
CIP 5	Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S
NOR 10	Norfloxacina	S	S	S	S	S	S
AMP 10	Ampicilina	S	R	S	S	R	S
NIT 300	Nitrofurantoina	S	S	S	S	S	S
GEN 10	Gentamicina	S	S	S	S	S	S
AMI 30	Amicacina	S	S	S	S	S	S
CRO 30	Ceftriaxona	S	S	R	S	I	S

S: Sensível, R: Resistente, I: Intermediário; T, U, V, W, X, Y: isolados de *E. coli*

Fonte: Autoria própria (2023)

No ponto 3, o antibiótico Ampicilina demonstrou ineficiência em dois dentre os seis isolados avaliados, enquanto a Ceftriaxona foi ineficaz para 1 dos isolados (isolado V) avaliados que apresentou resistência e demonstrou comportamento intermediário para o isolado X. Para os demais antibióticos e isolados investigados, os antibióticos mostraram-se eficientes.

Este ponto chama bastante atenção, devido estar localizado próximo à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), por isso deveria ter apresentado maior número de bactérias resistentes, em função de receberem uma grande quantidade de poluentes e principalmente de microrganismos. Em contrapartida, essa contaminação foi mínima, uma das razões seria a efetividade no tratamento desse efluente, que reduzem a carga microbiana e de nutrientes.

Analisando os resultados do teste de suscetibilidade dos três pontos de amostragem, evidencia-se em escala de maior resistência aos antibióticos ampicilina e norfloxacin, posteriormente a ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina e nitrofurantoina. O único antimicrobiano que se apresentou eficiente nos três pontos de coleta, foi a amicacina.

Resultados semelhantes foram apresentados por Torres *et al.*, (2020), tendo também resistência aos medicamentos ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina, nitrofurantoina e norfloxacin, coletados igualmente no Rio Alegria. Percebe-se que mesmo após dois anos, a resistência apresentada a este grupo de antibióticos ainda é a mesma.

Em um estudo realizado por Leite *et al.* (2020), acerca da resistência antimicrobiana a *E.coli*, obtiveram resultados similares a este, tendo resistência a ciprofloxacina, norfloxacin, ampicilina, nitrofurantoina, ceftriaxona e gentamicina. Isso se caracteriza, devido esses serem os principais medicamentos utilizados na clínica médica.

Os graus de resistência aos antibióticos β -Lactâmicos (ampicilina e ceftriaxona), é devido ao fato de serem a classe de medicamentos mais utilizados para tratamento de doenças infecciosas, como infecções de urina, respiratórias, garganta, pneumonia e entre vários outros (VASCONCELOS, et al., 2010).

Segundo Diniz e Santos (2017), a ciprofloxacina é um dos medicamentos que mais vem apresentando ineficácia a *E. coli* no ambiente hospitalar, devido ser diversas vezes receitado aos pacientes, desse modo, é aconselhado que seu uso seja mais restringido. Essa resistência ocorre por meio da habilidade intrínseca da *E. coli*

quando exibida em um ambiente de pressão seletiva, atingindo todo o grupo das quinolonas ou fluoroquinolonas (VASCONCELOS, *et al.*, 2010).

Essa frequência de linhagens resistentes, traz uma grande preocupação, devido as opções terapêuticas ficarem restritas, pois dificultam os tratamentos a serem realizados nos pacientes que apresentam alguma infecção por essa bactéria (LEITE, *et al.*, 2020).

Considerando os pontos de coletas estudados, pode-se perceber que houve maiores concentrações de bactérias no período do inverno (coleta 1 e 2). Essa estação é a que mais contribui para o aparecimento de doenças respiratórias, desse modo, faz com que aumente a prescrição de antibióticos e possibilite a multiplicação de bactérias resistentes no ambiente aquático (MEZZOMO; CARGNIN; SANDRIN, 2014), corroborando para os resultados obtidos nessa época.

Contudo, ao observarmos os resultados de forma geral, percebe-se que o ponto 2 foi o que mais apresentou isolados resistentes, mostrando resistência a quase todos os antibióticos. Por ser um ponto localizado na parte central da cidade, justifica tamanha contaminação de antibióticos que são utilizados pela população, e que acabaram refletindo neste resultado.

5.3 Índice MAR

Os resultados do índice de múltipla resistência (MAR) dos isolados de *E.coli*, são mostrados na tabela 5.

**Tabela 5 - Índice de múltipla resistência a antimicrobianos
(continua)**

ÍNDICE MAR					
PONTO 1		PONTO 2		PONTO 3	
Isolados	MAR	Isolados	MAR	Isolados	MAR
A	0,14	K	0,14	T	--
B	0,28	L	0,14	U	0,14
C	0,57	M	--	V	0,14
D	--	N	--	W	--
E	0,14	O	0,85	X	0,14

**Tabela 5 - Índice de múltipla resistência a antimicrobianos
(conclusão)**

PONTO 1		PONTO 2		PONTO 3	
Isolados	MAR	Isolados	MAR	Isolados	MAR
F	--	P	0,42	Y	--
G	--	Q	--		
H	0,14				
I	0,14				
J	--				

--: não houve resistência

Fonte: Autoria própria (2023)

Com base na tabela, dos 23 isolados exibidos 4 deles (17,4%) apresentaram o índice MAR superior a 0,2, demonstrando multirresistência, ou seja, resistência associada a dois ou mais dos sete antimicrobianos testados.

No ponto 1, dos dez isolados testados 20% apresentaram multirresistência, e no ponto 2 dos sete isolados, 28,57% demonstraram multirresistência. Enquanto que no ponto 3 nenhum dos isolados exibiram índice MAR superior a 0,2.

Este percentual indicando multirresistência nos pontos 1 (rural) e 2 (urbano) estão relacionados com os fármacos utilizados pelos seres humanos e animais. Em uma pesquisa realizada por Ben *et al.* (2018), concluiu-se que cada vez mais os resíduos de antibióticos provenientes das práticas agropecuárias e de efluentes domésticos dominam os ambientes aquáticos, ocasionando a seleção de cepas resistentes, se transformando em um grande perigo para a sociedade.

Para Mota *et al.* (2005), a presença de linhagens de *E. coli* resistentes a antimicrobianos é preocupante por dificultar o tratamento de doenças em animais e humanos, agravando os quadros clínicos curáveis, este índice de multirresistência está relacionado ao fenômeno de pressão seletiva, que favorece a proliferação de espécies resistentes no ambiente aquático (VASCONCELOS, *et al.*, 2010).

Na pesquisa realizada por Torres *et al.* (2020), foi indicado 92% de multirresistência para os isolados de *E. coli* nas amostras coletadas no Rio Alegria. Observa-se que esse valor é bem superior do resultado obtido das análises realizadas neste estudo.

A multirresistência demonstra a ameaça que uma bactéria em potencial pode causar a esse manancial. Com isso, a preocupação com microrganismos resistentes

vem crescendo cada vez mais, por afetar a saúde pública, dificultando o tratamento de doenças ocasionadas por esta bactéria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados evidenciaram a presença de coliformes termotolerantes em todos os pontos de coleta, mas apresentaram maiores números destas bactérias nos pontos 1 e 2, localizados na zona rural e urbana da cidade.

Nos pontos 1, 2 e 3 foram isoladas 10, 7 e 6 cepas de *Escherichia coli* respectivamente e os pontos 1 e 2, foram os que apresentaram o maior número de isolados resistentes. O isolado O, localizado no ponto 2 apresentou 87,5% de resistência.

De todos os antimicrobianos testados, os isolados em geral apresentaram maior resistência aos antibióticos ampicilina, norfloxacin e ciprofloxacina, e sensibilidade a amicacina.

O índice de múltipla resistência foi calculado, e demonstrou que de todos os isolados testados, 17,4% apresentaram multirresistência (índice superior a 0,2), indicando que estas bactérias possuem informações genéticas de variadas classes de antimicrobianos, demonstrando os efeitos do amplo consumo de antibióticos utilizados pela população. Os pontos 1 e 2 novamente apresentaram isolados com os maiores índices de múltipla resistência.

Neste experimento observou-se que o meio rural e urbano atuam como disseminadores de coliformes no Rio Alegria e que, pela presença da *Escherichia coli*, favorecem a transferência horizontal de genes de resistência.

Sugere-se dar continuidade ao experimento com a realização de novas coletas em diferentes pontos do rio Alegria (ambiente rural e urbano) e durante um período de aproximadamente 12 meses.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, E. C. C. **Resistência de cepas gram-negativas a antibacterianos em efluentes de hospitais públicos e na estação de tratamento de esgoto de Boa Vista – RR.** Boa Vista, 2020. p. 111. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima – UFRR, 2020.

ALVES, S. G. S.; ATAIDE, C. D. G.; SILVA, J. X. Análise microbiológica de coliformes totais e termotolerantes em água de bebedouros de um parque público de Brasília, Distrito Federal. **Rev. Cient. Sena Aires**. Brasília: 2018 [s.n.].

ANDRADE, G. F.; BARROS, D. B. Bioindicadores Microbiológicos para Indicação de poluição Fecal. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 34, p. e1099, 7 out. 2019.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 06/2021: Implementação do Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos (PGA) em hospitais.** Brasília, 10 dez. 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico: principais grupos disponíveis para uso clínico.** Anvisa, 2007. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em 09 de maio de 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico: Mecanismos de ação.** Anvisa, 2007. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm> Acesso em 09 de maio de 2022.

ANZOLIN, T. **Diagnóstico ambiental de fragmentos do rio alegria (Medianeira-PR) através de um protocolo de avaliação rápida e de parâmetros físico-químicos.** 2013. p.47. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2013.

APHA. **American Public Health Association**, 2021. Disponível em: <<https://www.apha.org/>> Acesso em 16 de maio de 2022.

ARAÚJO, M. C. **Avaliação do perfil de resistência de isolados de enterobactérias oriundas do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** 2019, p.50. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Ciências biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

ARSAND, J. B. **Avaliação ambiental da presença de contaminantes emergentes em água de rio utilizando espectrometria de massa.** Porto Alegre, 2019. p. 171. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2019.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Lisboa, 2013. p. 51. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, 2013.

BELL, V. **A receção da penicilina em Portugal: na literatura médico-farmacêutica e na imprensa diária (anos 40-50 do séc. XX)**. [s.l.] Imprensa da Universidade de Coimbra, 2019.

BEN, Y. *et al.* Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: a Review. **Environmental Research**, v.169, p. 483-493, 2018.

BRANCO, N. M. C.; ALBERT, A. L. M.; ROMÃO, C. M. C. P. A. Poluentes emergentes: Antimicrobianos no ambiente, a educação ambiental e o aspecto regulatório nacional e internacional. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e16910817083, 10 jul. 2021.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 4 ed. Brasília: FUNASA, 2013, p. 150.

BRASIL. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caderno estatístico, município de Medianeira**. IPARDES, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília: Ministério da Saúde (MS), 2019, p. 24.

BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. **Conselho Nacional de Meio Ambiente**.

BRASIL. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico Temático Serviços de Água e Esgoto: Visão Geral ano de referência 2020**. Brasília: SNIS, dez. 2021.

BRASIL. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). **Mapa de Indicadores de Esgoto**. Painel de indicadores, 2021. Disponível em: <http://appsnis.mdr.gov.br/indicadores/web/agua_esgoto/mapa-esgoto> Acesso em 3 de maio de 2022.

BRCAS. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), vs.6, 2017.

BRCAS. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponível em: <<http://brcast.org.br/documentos/>> Acesso em 16 de maio de 2022.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.

CARTAXO, A. DA S. B. *et al.* Contaminantes emergentes presentes em águas destinadas ao consumo humano: ocorrência, implicações e tecnologias de tratamento. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61814–61827, 2020.

CHO, S.; JACKSON, C. R.; FRYE, J. G. The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of Salmonella, *Escherichia coli* and Enterococcus sp. in surface water. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 3–25, 10 jul. 2020.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 32 ed. CLSI supplement M100. CLSI, 2022.

DEPIZZOL, F. **Avaliação da resistência a antibióticos em isolados de *Escherichia coli* provenientes de esgoto hospitalar e sanitário**. Vitória – ES, 2006. p. 144. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2006.

DINIZ, A. M.; SANTOS, R. M. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados em hospital universitário de Manaus, 2015. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.7, n.1, p.20-24, 2017.

FERNANDES, A. L. **Antibióticos do Século XX - Ascensão e Declínio**. 2017. p. 60. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve Faculdade de Ciências e Tecnologia.

FERREIRA, M. L. **Avaliação da contaminação das águas subterrâneas por efluentes domésticos na região de Águas Claras, município de Viamão – RS**. Porto Alegre, 2018. v. 1, p. 66. Dissertação de mestrado – Mestrado em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2018.

FILHO, H.R.C.A. A Universidade de Oxford e o seu papel na descoberta da penicilina cristalina e na produção de vacina contra a Covid-19. **Jornal Memorial da Medicina**, v. 3, n. 2, p. 32–34, 29 dez. 2021.

FLECK, L. *et al.* Análise físico-química da qualidade da água do rio alegria localizado no município de Medianeira-Pr. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**, v.1, n.5, 2012.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 470-473, set./out.2008.

GONÇALVES, C. M. A. **A importância clínica dos antibióticos β -lactâmicos**. Porto, 2019. p. 67. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2019.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. **Revista Unilago**, cap. 1, 2018.

- JOSEPH, S. M. *et al.* Longitudinal Comparison of Bacterial Diversity and Antibiotic Resistance Genes in New York City Sewage. **mSystems**, v. 4, n. 4, 27 ago. 2019.
- KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 1 jul. 2017.
- KARKMAN, A. *et al.* Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220–228, 1 mar. 2018.
- KOCH, N. *et al.* Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100027, 1 dez. 2021.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165–170, jul. 1983.
- LEITE, M. S. *et al.* Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de amostras de urina de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista brasileira de análises clínicas**, p. 243-247, 2020.
- LUZ, M. V. S. *et al.* Estudo da qualidade das águas superficiais na foz do rio Lucaia, Salvador (BA), Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e736986287, 31 jul. 2020.
- MACHADO, O. V. O. *et al.* **Antimicrobianos**: revisão geral para graduandos e generalistas. Fortaleza: EdUnichristus, 2019.
- MALLMANN, W. L.; DARBY, C. W. Uses of a Lauryl Sulfate Tryptose Broth for the Detection of Coliform Organisms. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 31, n. 2, p. 127–134, fev. 1941.
- MANYI-LOH, C. *et al.* Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 795, 30 mar. 2018.
- MARTINS, A. B. C.; ROCHA, J. P.; SANTANA, C. G. Análise dos impactos causados pelo lançamento de efluentes domésticos não tratados e sua relação com a capacidade de autodepuração de um corpo hídrico. **Revista do CEDS**, n. 9, ago./dez. 2018.
- MEDIANEIRA, Prefeitura Municipal de Medianeira - PR. **Plano Municipal de Saneamento Básico (PMSB)**. Medianeira, 2018.
- MENEZES, J. *et al.* Qualidade da água superficial em área rural. **Caderno de Estudos Geoambientais (CADEGO)**, v.3, n.1, p.32-43, 2012.
- MESQUITA, R. F. *et al.* Uso racional de antimicrobianos e impacto no perfil de resistência microbiológica em tempos de pandemia pela Covid-19. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e58211125382, 16 jan. 2022.

MEZZOMO, G. L.; CARGNIN, E.; SANDRIN, L. N. A. Infecções respiratórias altas em adultos usuários de uma unidade básica de saúde do município de Chapecó. **Revista Saúde Pública**. Santa Catarina, Florianópolis, v. 7, n. 2, p. 61-81, maio/ago. 2014.

MIRANDA, C. *et al.* Implications of antibiotics use during the COVID-19 pandemic: present and future. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3413–3416, 1 dez. 2020.

MONTAGER, C.C.; VIDAL C.; ACAYABA R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v.40, n.9, 11 jul. 2017.

MOTA, R.A. *et al.* Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

NASCIMENTO, E. D. **Resistência bacteriana em reservatórios do semiárido brasileiro**: caracterização, ações para vigilância ambiental, prevenção e educação em saúde. Natal, 2016. p.273. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Associação Plena em Rede) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2016.

NOVO, A. *et al.* Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 5, p. 1875–1887, 1 abr. 2013.

PERES, B. M. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto**. São Paulo, 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo – USP, 2011.

PRESTES, T. M. V. *et al.* Análises microbiológicas das águas do rio Alegria e de seu afluente rio Bolinha do município de Medianeira, PR, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.5, n.2, p. 15–24, 2011.

QUINELATO, R. Questão comentada grupos funcionais da azitromicina. **Blog do vestibular**, 2018. Disponível em: <<https://www.blogdovestibular.com/questoes/questao-comentada-grupos-funcionais-azitromicina.html>> Acesso em 16 de maio de 2022.

RAGASSI, B. **Monitoramento de fármacos em água superficial e efluente de estação de tratamento de esgoto no município de Dracena – SP**. Ilha Solteira, 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, 2018.

RESENDE, J. A.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G. Aquatic environments in the One Health context: modulating the antimicrobial resistance phenomenon. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, 2020.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 40–56, 1 nov. 2017.

RÍOS-TOBÓN, S.; AGUDELO-CADAVID, R. M.; GUTIÉRREZ-BUILES, L. A. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, v. 35, n. 2, p. 236–247, 10 maio 2017.

SAHA, M.; SARKAR, A. Review on Multiple Facets of Drug Resistance: A Rising Challenge in the 21st Century. **Journal of Xenobiotics**, v. 11, n. 4, p. 197–214, 13 dez. 2021.

SANTOS, L.; RAMOS, F. A contribuição da aquacultura para a emergência, disseminação e transferência de resistência bacteriana aos antibióticos: origem, potenciadores e soluções. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v.8, n. 1, p. 69–80, 31 jul. 2019.

SILVA, A. S. **Qualidade de água de abastecimento na zona rural de Santa Rita – PB e propostas de melhoria**. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2019.

SILVA, K. C. **Caracterização de Pseudomonas aeruginosa encontradas colonizando e/ou infectando pacientes queimados internados em um hospital público da cidade do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado), Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2016.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, T. S. M. **Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos**. Rio de Janeiro, 2021. p. 77. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 2021.

SOLER, N.; FORTERRE, P. Vesiduction: the fourth way of HGT. **Environmental Microbiology**, 2020

SULFADIAZINA. *In: Wikipédia*, a enciclopédia livre. 2021. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Sulfadiazina>> Acesso em 14 de maio de 2022.

SULFAMETOXAZOL. *In: Wikipédia*, a enciclopédia livre. 2021. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Sulfametoxazol>> Acesso em 14 de maio de 2022.

TEIXEIRA, A. R.; FIGUEIREDO, A. F. C.; FRANÇA, R. F. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em foco**, ed. 11, p. 853-875, 2019.

TETRACICLINA. *In: Wikipédia*, a enciclopédia livre. 2021. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Tetraciclina>> Acesso em 16 de maio de 2022.

TORRES, M. K. *et al.* Resistência antimicrobiana em *E. coli* isolada do Rio Alegria – Medianeira, PR. **XXV Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR (SICITE)**, 2020.

TUCCI, C. E. M. Águas urbanas: Desenvolvimento urbano. **Estudos avançados**, v. 22, p. 97-112, 2008.

VASCONCELOS, F. R. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 405–410, set. 2010.

VASCONCELLOS, F.C.; IGANCI, J.R.V.; RIBEIRO, G.A. Qualidade microbiológica da água do rio são lourenço, são lourenço do sul, rio grande do sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.177-181, abr./jun. 2006.

VECCHIA, A.D. *et al.* Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. **Revista saúde e ambiente/Health and Environment Journal**, v. 10, n. 2, p. 65-70, dez. 2009.

VILLAR, P. C.; GRANZIEIRA, M. L. M. Unidade 3: o tratamento jurídico das águas subterrâneas no ordenamento brasileiro. *In: ÓRGÃO SUPERIOR (Brasil)*. Agência Nacional de Águas. **Direito de águas à luz da governança**. Brasília, DF: ANA, 2019. p. 5-49.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. American Society for Microbiology. ASM Press: Washington, 2003.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>> Acesso em: 22, abril de 2022.

WRIGHT, G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1451–1470, 29 jul. 2005.