

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Escola de Engenharia  
Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Gabriela Fernandes Coelho

**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESGOTO SANITÁRIO E  
EFLUENTE DE LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO NA REGIÃO DE BELO HORIZONTE/MG,  
DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19**

Belo Horizonte  
2022

Gabriela Fernandes Coelho

**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESGOTO SANITÁRIO E  
EFLUENTE DE LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO NA REGIÃO DE BELO HORIZONTE/MG,  
DURANTE A PANDEMIA DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientador: Dr<sup>a</sup> Juliana Calábria de Araújo

Coorientador: Dr<sup>a</sup> Elayne Cristina Machado

Belo Horizonte  
2022

C672i

Coelho, Gabriela Fernandes.

Investigação da resistência antimicrobiana em esgoto sanitário e efluente de lagoas de estabilização na região de Belo Horizonte/MG, durante a pandemia da COVID-19 [recurso eletrônico] / Gabriela Fernandes Coelho. – 2022.

1 recurso online (133 f. : il., color.) : pdf.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Coorientadora: Elayne Cristina Machado.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 113-133.

Bibliografia: f. 103-112.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Esgotos - Tratamento - Teses. 4. Lagoas de estabilização - Teses. 5. COVID-19 (Doença) - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Machado, Elayne Cristina. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
[ESCOLA DE ENGENHARIA]  
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM [SANEAMENTO, MEIO AMBIENTE E RECURSOS  
HÍDRICOS]

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

"Investigação da Resistência Antimicrobiana Em Esgoto Sanitário e Efluente de Lagoas de Estabilização Na  
Região de Belo Horizonte/mg, Durante A Pandemia da Covid-19"

**GABRIELA FERNANDES COELHO**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

Profa Juliana Calábria de Araújo

Profa Silvia Maria Alves Correa Oliveira

Profa Silvana de Queiroz Silva

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Versão Final aprovada por

Profa. Priscilla Macedo Moura

Profª. Juliana Calábria de Araújo

Coordenadora

Orientadora

Belo Horizonte, 04 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva, Usuário Externo**, em 04/08/2023, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Maria Alves Correa Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 04/08/2023, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Calabria de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 17/08/2023, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Macedo Moura, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 12/04/2024, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2508306** e o código CRC **2385AFEF**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à Deus por permitir a realização de mais uma conquista; por colocar em minha vida pessoas e seres incríveis dispostos a me amar e apoiar; por me abençoar diariamente com situações que me fazem evoluir; pelos obstáculos, que me ensinam a ser mais forte e a acreditar mais em mim mesma; por toda a luz que recebo a cada momento, que iluminam a mim e meus caminhos. Agradeço aos meus guardiões e mentores por estarem comigo em todos os instantes, por mais difíceis que estes sejam; por me guiarem; por toda a proteção, todo o amor e pelos ensinamentos e intuições.

Agradeço aos meus pais, Eunice e Marcelo, por todo o apoio, amor e carinho; por me motivarem a continuar perseguindo meus sonhos e por me ensinarem a lutar por eles. Sou e serei eternamente grata por ter vocês como meus pais nesta vida. Ao meu irmão, Henrique, por me apoiar, pelo amor, carinho e pela paciência e alegrias constantes. Às minhas avós queridas, Gonçalves e Irene, por todas as orações e pelo imensurável amor e carinho, e à todos os meus familiares, por torcerem por mim.

À prof<sup>a</sup> Juliana Calábria de Araújo, pela cuidadosa orientação acadêmica; pelos ensinamentos passados, pelas oportunidades oferecidas e pela confiança depositada em mim. Agradeço por estar sempre presente e por fazer parte desta trajetória de muito aprendizado.

Agradeço infinitamente a minha coorientadora e amiga, Elayne Cristina Machado, por se dispor a me ajudar e pelo auxílio nas análises laboratoriais e ensinamentos, além dos momentos alegres e de descontração.

Aos meus amigos de Resende Costa (Bruna, Renata, Taína, Paulo Henrique, Isabella, Isadora), e meu amigo César, pelo apoio constante repleto de amor e confiança, pelas risadas e pela parceria. Aos amigos que em Belo Horizonte tive o privilégio de encontrar (Izabela, Yasmim, Amanda T, Amanda L, Tatiane, Ana Carolina, Cássia), que fizeram essa trajetória se tornar mais leve e enriquecedora, recheada de alegria e amor.

À Brenda, por estar ao meu lado em todos os momentos, sejam estes alegres ou difíceis; pelos conselhos e pelo ombro amigo; você é luz e sou imensamente grata pela sua amizade.

À Cíntia, por todo o auxílio e pelos pacientes ensinamentos, especialmente nas análises de qPCR, assim como pelo cuidado e organização do ambiente de trabalho.

Às professoras Silvana de Queiroz Silva e Sílvia Maria Alves de Corrêa Oliveira, por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora deste trabalho. Aos professores do DESA, por compartilharem seus conhecimentos nas disciplinas ministradas durante o curso.

Ao corpo técnico do PPG-SMARH, DESA e Escola de Engenharia, e aos demais funcionários. Às agências de fomento por viabilizarem o desenvolvimento desta pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro; Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. À UFMG, pelo apoio institucional.

*“Que todos os seres sejam livres e felizes, que todos os nossos pensamentos, palavras e ações contribuam de alguma forma para a felicidade e liberdade de todos. Que haja paz, a mais perfeita paz.”*



## RESUMO

A resistência antimicrobiana (RAM) é um dos principais desafios globais em saúde pública, e as estações de tratamento de esgoto (ETEs) desempenham um papel crucial na remoção, seleção e disseminação de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) e genes de resistência a antibióticos (GRAs) para o ambiente aquático. Este estudo investigou a ocorrência de BRAs e GRAs em esgoto bruto de três ETEs na região de Belo Horizonte durante a pandemia da COVID-19, avaliando o impacto da pandemia no aumento e disseminação da RAM, comparando com valores reportados em pesquisas prévias e literatura. Foi analisada a eficiência de remoção de BRAs e GRAs em um sistema de lagoa facultativa, seguido de lagoa de maturação (ETE 3). Dessa forma, coletou-se amostras semanais de esgoto bruto das três ETEs, bem como amostras de efluente tratado da ETE 3, durante outubro/2021 e junho/2022. Para as análises microbiológicas e moleculares, foi feita a quantificação e isolamento de bactérias heterotróficas totais (BHTs) e BRAs cultiváveis sem e com a adição de antibióticos, sendo algumas colônias identificadas pela técnica Maldi-tof. Destas, as cepas selecionadas foram caracterizadas quanto a suscetibilidade e resistência a vários antibióticos, a fim de determinar o caráter de multirresistência. Os genes de resistência *sul1*, *ermB*, *qnrB*, *bla*TEM, *tetA*, *integron* classe 1 (*int1*) e gene RNAr 16S foram quantificados via *Polymerase Chain Reaction* em tempo real (qPCR). Os resultados mostraram concentrações semelhantes de BHTs e BRAs nas três ETEs, exceto para bactérias resistentes à amoxicilina e meropenem, que apresentaram diferenças significativas. Quanto aos GRAs, observaram-se diferenças significativas entre as ETEs, com maiores abundâncias absolutas na ETE específica investigada. O sistema de tratamento de lagoas facultativas seguido por lagoa de maturação apresentou remoção de BRAs e GRAs, com reduções médias de 1,2 a 2,6 unidades log para BRAs e valores médios de remoção de 0,7 a 3,1 unidades log para GRAs. No entanto, o efluente tratado ainda apresentava níveis consideráveis de GRAs (cerca de  $10^3$  cópias/mL). Entre as bactérias resistentes identificadas, foram encontrados gêneros pertencentes à lista dos seis patógenos prioritários definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tanto no esgoto bruto (como *Klebsiella pneumoniae*, e gêneros *Staphylococcus*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*) quanto no efluente tratado (*Enterobacter cloacae* e *Enterobacter asburiae*), com fenótipo de multirresistência. Ao comparar os resultados com estudos prévios na região metropolitana de Belo Horizonte/MG, verificou-se um aumento nas concentrações de BHTs (0,9 a 1,2 unidades log), algumas BRAs (resistentes a amoxicilina e sulfametoxazol e trimetoprim, sendo cerca de 1,0 e 0,7 log) e GRAs (*ermB* e *qnrB*, sendo cerca de 2,0 e 1,0 log maiores) durante a pandemia, sugerindo o impacto da COVID-19 no aumento da circulação e disseminação desses agentes no esgoto bruto. O sistema de tratamento utilizado demonstrou eficiência na redução desses agentes, embora sejam necessárias estratégias adicionais para garantir uma remoção mais completa. Esses resultados contribuem para o conhecimento sobre a disseminação de BRAs e GRAs em sistemas de tratamento de esgoto e podem auxiliar na implementação de medidas de controle e prevenção da RAM.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Tratamento de esgotos. Lagoas de estabilização. COVID-19. BRAs e GRAs.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AR) is one of the main global challenges in public health, and the Wastewater treatment plants (WWTPs) plays a crucial role in the removal, selection and dissemination of antibiotic resistant bacteria (ARBs) and antibiotic resistance genes (ARGs). This study aimed to investigate the occurrence of ARBs and ARGs in the influent of three WWTPs in the region of Belo Horizonte during the COVID-19 pandemic, evaluating the impact of pandemic on the increase and dissemination of AR, compared to values reported in prior research and literature. The removal efficiency of ARBs and ARGs was analyzed in an facultative pond system, followed by maturation pond (WWTP 3). Thus, weekly samples of influent of three WWTPs, as well as effluent samples of the WWTP 3, during October/2021 and June/2022 were collected. For microbiological and molecular analyzes, the quantification and isolation of total heterotrophic bacteria (THBs) and cultivable ARBs without and with the addition of antibiotics, and some colonies identified by the Maldi-toof technique. Of these, selected strains were characterized as susceptibility and resistance to various antibiotics, in order to determine the multidrug-resistant (MDR) bacterias. The resistance genes *sul1*, *ermB*, *qnrB*, *blaTEM*, *tetA*, class 1 *integron* (*int1*) e RNAr 16S gene were quantified with Polymerase Chain Reaction in real-time (qPCR). The results showed similar concentrations of THBs and ARBs in the three ETES, except for bacteria resistant to amoxicillin and Meropenem, which presented significant differences. As for ARGs, significant differences were observed between WWTPs, with greater absolute abundances in the specific investigated (WWTP 3). The facultative pond treatment system followed by maturation pond presented removal of ARBs and ARGs, with average reductions of 1.2 to 2.6 log units and average removal values from 0.7 to 3.1 log, respectively. However, the effluent still had considerable levels of ARGs (about  $10^3$  copies/mL). Among the resistant bacteria identified, genres belonging to the list of six priority pathogens defined by the World Health Organization (WHO), both in influent (such as *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus*, *Enterobacter* and *Acinetobacter*) as well as in the effluent (*Enterobacter cloacae* and *Enterobacter asburiae*), with multi-resistant phenotype. By comparing the results with previous studies in the metropolitan region of Belo Horizonte/MG, there was an increase in THBs concentrations (0.9 to 1.2 units log), some ARBs (resistant to amoxicillin and sulfamethoxazole and trimethoprim, about 1.0 and 0.7 log higher) and ARGs (*ermB* and *qnrB*, about 2.0 and 1.0 log) during the pandemic, suggesting the impact of COVID-19 in the increase of circulation and spread of these agents on sewage. The treatment system used has demonstrated efficiency in reducing these agents, although additional strategies are required to ensure more complete removal. These results contribute to the knowledge of the dissemination of bras and gras in sewage treatment systems and can assist in the implementation of AR control and prevention measures.

**Keywords:** Antimicrobial resistance. Wastewater treatment. Stabilization ponds. COVID-19. ARBs and ARGs.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Histórico de venda de medicamentos de 2017 a 2021 .....                                                                                                                               | 23 |
| Figura 2 – Panorama nacional para nº de óbitos por COVID-19 e nº de casos acumulados, por bimestre .....                                                                                         | 26 |
| Figura 3 – Exemplos dos tipos de mecanismos de resistência bacteriana .....                                                                                                                      | 29 |
| Figura 4 – Fluxograma simplificado do processo de tratamento utilizado na ETE 3 .....                                                                                                            | 45 |
| Figura 5 – Placa <i>petri</i> com meio de cultura, bactéria inoculada e discos de antibióticos dispostos .....                                                                                   | 48 |
| Figura 6 – Antibiograma, método de difusão em ágar .....                                                                                                                                         | 49 |
| Figura 7 – Concentrações absolutas de BHTs e BRAs nas amostras de EB das ETEs 1, 2 e 3, em UFC/mL (diferenças significativas assinaladas com *) .....                                            | 56 |
| Figura 8 – Concentrações absolutas de BHTs e BRAs nas amostras de EB e ET da ETE 3, em UFC/mL .....                                                                                              | 60 |
| Figura 9 – Eficiência de remoção (%) média e valores médios de remoção, com desvio padrão, em log, de BHTs e BRAs na ETE 3 .....                                                                 | 61 |
| Figura 10 – Série temporal para a concentração média de BHTs e BRAs no EB e ET das ETEs estudadas, por mês, em log (UFC/mL) .....                                                                | 72 |
| Figura 11 – Série temporal para o número de casos notificados e confirmados (novos) em BH/MG, entre outubro de 2021 e maio de 2022 .....                                                         | 73 |
| Figura 12 – Abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes investigados, nas amostras de esgoto bruto (EB) das ETEs em estudo (diferenças significativas assinaladas com *) .....               | 82 |
| Figura 13 – Gráfico <i>box-plot</i> de abundância relativa (GRAs/RNAr 16S) dos genes alvo da pesquisa, no EB das ETEs 1, 2 e 3 e ET da ETE 3 (diferenças significativas assinaladas com *) ..... | 84 |
| Figura 14 – Gráfico <i>box-plot</i> da abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes investigados, nas amostras de EB e ET da ETE 3 .....                                                      | 86 |
| Figura 15 – Eficiência de remoção (%) média e valores médios de remoção, em log, de elementos de resistência aos antibióticos na ETE 3 .....                                                     | 87 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Principais classes de antibióticos e indicações clínicas .....                                                        | 20 |
| Tabela 2 – Resistência intrínseca de algumas bactérias na presença de específicos antibióticos .....                             | 28 |
| Tabela 3 – Principais elementos genéticos de interesse em estudos relacionados ao tratamento de esgoto e patógenos humanos ..... | 33 |
| Tabela 4 – Principais características do sistema de tratamento de esgotos da ETE 3 .....                                         | 45 |
| Tabela 5 – Condições adotadas para os ensaios de qPCR .....                                                                      | 53 |
| Tabela 6 - Prevalência de resistência (BRAs/BHTs - %) aos antibióticos estudados no EB das ETEs 1, 2 e 3 e ET da ETE 3.....      | 58 |
| Tabela 7 – Concentrações médias aproximadas de BHTs e BRAs em EB e ET, reportadas na literatura e no presente estudo .....       | 67 |
| Tabela 8 – Características dos isolados em relação à origem e perfil de resistência a antibióticos .....                         | 80 |
| Tabela 9 – Concentrações médias aproximadas de GRAs em EB e ET, reportados na literatura e no presente estudo.....               | 91 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

ANA – Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico

AMC – Amoxicilina + ácido clavulânico

AMO – Amoxicilina

AZT – Azitromicina

BHT – Bactéria heterotrófica total

BR – Bactéria resistente

BRA – Bactérias resistentes à antibióticos

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CFX – Cefalexina

CLO – Clorafenicol

CT – Ciclo de *Threshold*

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DESA – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental

DDD – Doses diárias definidas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EB – Esgoto bruto

EGM – Elemento genético móvel

ERI – Eritromicina

ERT – Ertapenem

ESPII – Emergência de saúde pública de importância internacional

ES – Efluente tratado

EST – Estreptomicina

ETE – Estação de tratamento de esgoto

EU – União Europeia

FAS – Filtro Aerado Submerso

FBP – Filtro Biológico Percolador

FQ – Tratamento Físico-Químico

g – grama

GLASS – *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*

GRA – Genes de resistência à antibióticos

ha – hectares

hab – habitantes

IBC – Infecção bacteriologicamente confirmada

INS – Instituto nacional de saúde

IPCSL – Infecção primária da corrente sanguínea laboratorial

IPM – Imipenem

L – litro

LA – Lodos Ativados

LAC – Lodos Ativados Convencional

LAT – Lagoa de alta taxa

LF – Lagoa Facultativa

LM – Lagoa de Maturação

LNA – Lagoa naturalmente aerada

log – logarítimo

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*

m – metros

MDR – *Multi-drug resistance*

MH – *Mueller Hinton Agar*

mL – mililitro

MS – Ministério da Saúde

MRP – Meropenem

n – número

PCA – *Plate Count Agar*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pb – par de base

PR – Plasmídeo recombinante

PTA – Países, territórios e áreas

qPCR – *Polymerase Chain Reaction* em tempo real

RAM – Resistência antimicrobiana

RM – Resistência microbiana

RNA – Ácido ribonucleico

RSA – Radiação Solar Artificial

SNGPC – Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

TDH – Tempo de detenção hidráulica

TRIAZOL – Sulfametoxazol + trimetoprim

TSA – Teste de suscetibilidade antimicrobiana

TVG – Transferência vertical de gene

THG – Transferência horizontal de gene

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV – Ultravioleta

WC – *Wetlands* construídas

WHO – *World Health Organization*



## SUMÁRIO

|       |                                                                                                                                                        |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                        | 14 |
| 2     | OBJETIVOS.....                                                                                                                                         | 18 |
| 2.1   | Objetivo Geral .....                                                                                                                                   | 18 |
| 2.2   | Objetivos Específicos .....                                                                                                                            | 18 |
| 3     | REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                                                                            | 19 |
| 3.1   | Antimicrobianos .....                                                                                                                                  | 19 |
| 3.2   | Antibióticos.....                                                                                                                                      | 19 |
| 3.2.1 | O aumento no consumo de antibióticos no decorrer dos anos e perante a pandemia da COVID-19 .....                                                       | 21 |
| 3.2.2 | Síntese e panorama dos casos de COVID-19 no Brasil.....                                                                                                | 25 |
| 3.3   | Resistência antimicrobiana .....                                                                                                                       | 27 |
| 3.3.1 | Bactérias resistentes a antibióticos e mecanismos de resistência.....                                                                                  | 27 |
| 3.3.2 | Genes de resistência a antibióticos e elementos genéticos móveis .....                                                                                 | 29 |
| 3.4   | Resistência a antibióticos (RA) no ambiente .....                                                                                                      | 34 |
| 3.5   | Diversidade microbiana em esgotos sanitários .....                                                                                                     | 36 |
| 3.6   | Estações de Tratamento de Esgoto e os elementos de resistência.....                                                                                    | 39 |
| 3.7   | Sistema de lagoas de estabilização .....                                                                                                               | 42 |
| 4     | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                | 44 |
| 4.1   | Área de estudo.....                                                                                                                                    | 44 |
| 4.2   | Coleta de amostras .....                                                                                                                               | 45 |
| 4.3   | Análises microbiológicas de BHTs e BRAs cultiváveis: quantificação e isolamento .....                                                                  | 46 |
| 4.4   | Pesquisa por cepas multirresistentes (MDR) entre as BRAs isoladas e identificadas: investigação de suscetibilidade e resistência aos antibióticos..... | 47 |
| 4.5   | Processamento das amostras para análise de genes de resistência .....                                                                                  | 49 |
| 4.6   | Análises moleculares .....                                                                                                                             | 50 |
| 4.6.1 | Extração de DNA .....                                                                                                                                  | 50 |
| 4.6.2 | Quantificação de elementos genéticos de resistência a antibióticos .....                                                                               | 50 |
| 4.7   | Análise de dados.....                                                                                                                                  | 54 |
| 4.8   | Análises estatísticas.....                                                                                                                             | 55 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                                           | 56 |
| 5.1   | Ocorrência e prevalência de bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes aos antibióticos nas ETEs estudadas .....                          | 56 |
| 5.1.1 | Concentrações absolutas de BHTs e BRAs e prevalência de resistência aos antibióticos investigados no esgoto bruto das três ETEs de estudo .....        | 56 |
| 5.1.2 | Investigação da ocorrência e remoção de BHTs e BRAs em sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação (ETE 3) .....                       | 60 |

|       |                                                                                                                                                                                              |     |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.3 | Concentrações de BHTs e BRAs reportadas na literatura e no presente estudo .....                                                                                                             | 65  |
| 5.2   | Identificação dos isolados de BHTs e BRAs em amostras de EB e ET coletadas em três regiões distintas na região metropolitana de Belo Horizonte, MG .<br>.....                                | 76  |
| 5.3   | Antibiograma dos isolados de BRAs das amostras de EB e ET para verificação de multirresistência ( <i>Multidrug resistance</i> – MDR).....                                                    | 79  |
| 5.4   | Ocorrência e prevalência de elementos genéticos de resistência a antibióticos nas ETEs estudadas .....                                                                                       | 82  |
| 5.4.1 | Concentrações absolutas e relativas dos elementos genéticos pesquisados nos esgotos das ETEs .....                                                                                           | 82  |
| 5.4.2 | Investigação da ocorrência e remoção de elementos de resistência a antibióticos em sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação (ETE 3) .....                                 | 86  |
| 5.4.3 | Abundância de elementos genéticos de resistência reportadas na literatura e no presente estudo .....                                                                                         | 90  |
| 6     | CONCLUSÕES.....                                                                                                                                                                              | 97  |
|       | REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                            | 99  |
|       | APÊNDICE A – Resultados obtidos da quantificação de BHTs e BRAs.....                                                                                                                         | 109 |
|       | APÊNDICE B – Resultados das análises estatísticas para BHTs e BRAs.....                                                                                                                      | 112 |
|       | APÊNDICE C – Resultados dos cálculos de eficiência de remoção (%) e valores de remoção em log medianos para BHTs e BRAs na ETE 3 .....                                                       | 114 |
|       | APÊNDICE D – Espécies de bactérias resistentes a pelo menos um dos 5 antibióticos, isoladas, identificadas e especificadas a partir das amostras de EB das ETEs 1, 2 e 3 e ET da ETE 3 ..... | 117 |
|       | APÊNDICE E – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR para a quantificação dos genes RNAr 16S, <i>int1</i> , <i>sul1</i> , <i>tetA</i> , <i>blaTEM</i> , <i>ermB</i> e <i>qnrB</i> .....       | 119 |
|       | APÊNDICE F – Resultados das análises estatísticas para os elementos genéticos ....<br>.....                                                                                                  | 126 |
|       | APÊNDICE G – Resultados dos cálculos de eficiência de remoção (%) e valores de remoção em log medianos para RNAr 16S, <i>int1</i> e GRAs na ETE 3 .....                                      | 128 |

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) mostrou que aproximadamente 700 mil pessoas vão à óbito, anualmente, em função das infecções causadas por bactérias resistentes. De acordo com relatório publicado pelo governo britânico, o cenário futuro para a resistência bacteriana aos antibióticos é preocupante, afirmando que essa resistência pode levar à morte de 10 milhões de pessoas por ano, até 2050. Além dessas estimativas, percebe-se que o impacto dar-se-á também no âmbito econômico, mostrando um prejuízo de 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2016).

Além de prejudicar significativamente cirurgias, transplante de órgãos e tratamentos como a quimioterapia, essas infecções derivadas de bactérias resistentes requerem medicamentos mais caros pois os antibióticos de primeira linha não funcionam e, além disso, a duração do tratamento e da doença aumentam, juntamente com os custos e encargos econômicos tanto para famílias quanto para a sociedade no geral (OPAS, 2022).

A resistência antimicrobiana é quando as bactérias, fungos, vírus e parasitas modificam suas características e deixam de responder aos medicamentos. As bactérias adquirem essa resistência por meio de interações com genes de resistência a antibióticos (GRAs) e resíduos de antibióticos, sobrevivendo em ambientes aquáticos e solo. Tal mudança nestes microrganismos tem se tornado cada vez mais preocupante pois, além de ameaçar a prevenção e o tratamento de uma série de infecções, aumentam o risco de propagação da doença, doenças graves e morte. Consequentemente, os medicamentos deixam de agir de maneira eficaz, persistindo no corpo e aumentando o risco de disseminação para outras pessoas (WHO, 2021).

Nos últimos anos, foi notificado um aumento significativo de surtos de infecções resistentes a medicamentos pela diretora da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), principalmente devido à inadequada utilização de medicamentos antimicrobianos no tratamento da COVID-19. Cerca de 90% dos pacientes contaminados com o vírus nas Américas receberam um antibiótico, mesmo quando somente cerca de 7% deles necessitavam desse tipo de tratamento para uma determinada infecção secundária (OPAS, 2021).

Langford *et al.* (2021) mostrou que cerca de 75% dos pacientes com COVID-19 receberam antibióticos, enquanto foram constatadas infecções bacterianas em somente 8,6% dos pacientes. A pesquisa envolveu países como: Europa, Estados Unidos, China, Oriente Médio e restante do leste/sudoeste da Ásia. Os antibióticos mais receitados foram dos grupos: fluoroquinolonas (20%), macrolídeos (18.9%), Beta-lactâmicos (15%), Cefalosporinas (15%).

De acordo com matéria publicada por Garcia (2022), no Brasil, os casos de infecção sanguínea em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) aumentaram no ano de 2020, após sete anos em queda entre os anos de 2012 a 2019, segundo dados publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes dados mostraram que a taxa de infecção primária da corrente sanguínea laboratorial (IPCSL) por 1.000 pacientes nas UTIs adultas caiu de 5,8 pontos para 3,9, entre 2012 e 2019. Essa taxa aumentou para 4,3 em 2020 (GARCIA, 2022).

Segundo Menezes (2021), no ano de 2019, foram enviados aproximadamente mil isolados de bactérias resistentes a antibióticos por laboratórios de saúde pública, de diferentes estados brasileiros, para o Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), atuante como laboratório de retaguarda da Sub-rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Sub-rede RM), estabelecida pela ANVISA e pelo Ministério da Saúde (MS). Já em 2020 e 2021, a quantidade de amostras positivas aumentou para cerca de 2 mil e 3,7 mil, respectivamente (FIOCRUZ, 2021).

Entre os candidatos possíveis para o tratamento contra o vírus, a associação entre a azitromicina (antibiótico) e hidroxicloroquina foi indicada em muitos locais e também estudada (GHAZY *et al.*, 2020; MILLION *et al.*, 2021). Algumas pesquisas mostram que a azitromicina, em conjunto com outros medicamentos, não possui eficácia para o tratamento da COVID-19 (GHAZY *et al.*, 2020). É válido ressaltar que a azitromicina está presente na lista de classificação de antibióticos para a avaliação e monitoramento de uso, publicada pela Organização Mundial da Saúde em 2019, constando como um grupo de antibiótico alvo-chave para observação, pois possuem maior potencial para resistência, incluindo agentes de prioridade mais alta entre os

antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana, além de apresentar risco relativamente alto na seleção de resistência bacteriana (WHO, 2019).

A capacidade desses microrganismos em sobreviver em ambientes diversos, como corpos d'água, sedimentos, solos e águas residuárias, é motivo de destaque entre cientistas, pesquisadores e organizações, visto que são contaminantes comuns especialmente em esgotos domésticos (WHO, 2021). Os estudos em Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) são imprescindíveis, pois este ambiente fornece uma fonte rica em nutrientes para as bactérias, correndo o risco de aumento da pressão seletiva de BRAs e GRAs ou transferência horizontal de genes (MANAIA *et al.*, 2018).

As ETEs são, normalmente, projetadas e operadas com o intuito de se atender aos padrões de lançamento de efluentes em corpos d'água previstos na legislação. Dessa forma, obtém-se redução das cargas de sólidos e matéria orgânica, principalmente (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Todavia, não prevê monitoramento e remoção para poluentes emergentes, como os antibióticos, BRAs e GRAs. Apesar de não se ter um padrão de lançamento destes poluentes biológicos emergentes (BRAs e GRAs), em países da Europa, existe a proposta de monitorar a RAM (e a remoção de BRA e GRAs) em efluentes domésticos, e ETEs que tratam esgoto a partir de 100.000 mil habitantes (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Esta diretiva da União Européia para países membros entrará em vigor em 2025. Importante salientar que na Europa entrou em vigor em 28/01/2022 a lei que regula a utilização de medicamentos de uso veterinário, mais uma medida do Plano de Ação europeu de Saúde Única na luta contra a resistência antimicrobiana.

Apesar do aumento de pesquisas sobre BRAs e GRAs em ETEs, a dinâmica desses agentes no esgoto afluente às ETEs durante a pandemia de COVID-19, bem como em sistemas de tratamento de lagoas, não está totalmente esclarecida. Logo, é imprescindível a determinação da ocorrência e identificação de BRAs e GRAs no esgoto, além de verificar a eficiência de remoção destes agentes em sistemas de tratamento.

Diante da problemática abordada, este trabalho investigou a ocorrência e identificação de bactérias resistentes à antibióticos em amostras de esgoto bruto, afluente de três diferentes estações de tratamento de águas residuais, na região de Belo

Horizonte/MG. Esta pesquisa foi realizada durante a pandemia da COVID-19, a fim de se verificar o impacto desta sobre o aumento, ou não, da abundância de BRAs e GRAs no esgoto bruto, visto que trabalhos prévios do grupo de pesquisa em resistência antimicrobiana foram realizados nas mesmas ETEs, em período anterior à pandemia (MACHADO *et al.*, 2022; LEROY-FREITAS *et al.*, 2022). Além disso, foram investigadas as eficiências de remoção de BRAs e GRAs no tratamento de esgotos sanitários provenientes de um sistema de lagoa facultativa, seguida por lagoa de maturação, de uma ETE da região de Belo Horizonte/MG.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a ocorrência de bactérias resistentes aos antibióticos (BRAs) e genes de resistência aos antibióticos (GRAs) em esgoto bruto de três diferentes estações de tratamento de esgotos (ETEs), e esgoto bruto e efluente tratado de uma das ETEs cujo sistema é composto por lagoas de estabilização, da região de Belo Horizonte/MG, durante a pandemia da COVID-19, de forma a avaliar o impacto da pandemia sobre o aumento e a disseminação da resistência antimicrobiana (RAM).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as concentrações de BRAs e GRAs no esgoto bruto das estações de tratamento de esgoto sanitário (ETE 1, ETE 2 e ETE 3);
- Avaliar as eficiências de remoção de BRAs e GRAs no tratamento de esgoto sanitário provenientes de lagoas facultativas, seguido por lagoa de maturação, referente à ETE 3;
- Identificar as BRAs cultiváveis e caracterizá-las quanto a suscetibilidade e resistência a vários antibióticos;

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Antimicrobianos**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define os antimicrobianos como qualquer agente químico, incluindo produtos químicos sintéticos, que possuem a capacidade de eliminar microrganismos ou impedir sua multiplicação e/ou crescimento, com a finalidade de prevenir a sua ação patogênica, sendo também utilizado para tratar infecções. São utilizados para a prevenção e tratamento de infecções em seres humanos, animais ou plantas, englobando os antibióticos, antifúngicos e antiparasitários. (WHO, 2014; WHO, 2021)

Madigan *et al.* (2016) pontuam os antimicrobianos como compostos responsáveis por eliminar ou controlar o crescimento de microrganismos no hospedeiro, apresentando uma toxicidade seletiva de forma a inibir ou matar os patógenos, sem que o hospedeiro seja afetado. Podem ser classificados com base na sua estrutura molecular, mecanismo de ação e espectro de atividade antimicrobiana e são divididos em dois grandes grupos: os antimicrobianos sintéticos e os antibióticos.

#### **3.2 Antibióticos**

Os antibióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde como qualquer substância química cuja produção se deu por meio de outros microrganismos (como bactérias ou fungos) ou por substâncias sintéticas ou semi sintéticas, capazes de matar (bactericidas) e/ou inibir (bacteriostáticos) o crescimento de microrganismos, como bactérias, fungos ou parasitas (WHO, 2014; KÜMMERER, 2009). Esses compostos podem ser diferenciados através de suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, mecanismos de ação e espectro de ação (WHO, 2014). Podem ser agrupados de acordo com sua estrutura química ou pelos mecanismos de ação, sendo divididos em subgrupos diferentes, como  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclina, aminoglicosídeos, entre outros (KÜMMERER, 2009; ANVISA, 2021). A Tabela 1 exemplifica algumas principais classes de antibióticos, com alguns exemplos, e suas principais indicações clínicas.



**Tabela 1 – Principais classes de antibióticos e indicações clínicas**

| <b>Classe</b> | <b>Exemplos de antibióticos</b>                                                                                              | <b>Indicações clínicas</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| β-lactâmicos  | Penicilinas:<br>Benzilpenicilinas, Aminopenicilinas,<br>Penicilinas de amplo espectro                                        | Pneumonias, otites e sinusites, faringites e epiglotites, infecções cutâneas, meningites bacterianas, infecções do aparelho reprodutor, endocardites bacterianas                                                                                                                                                |
|               | Cefalosporinas:<br>Cefalosporinas de primeira geração<br>(cefalotina, cefazolina, cefalexina,<br>cefadroxila)                | Infecções de pele, partes moles, faringite estreptocócica, infecções no trato urinário                                                                                                                                                                                                                          |
|               | Carbapenêmicos:<br>Imipenem, Meropenem, Ertapenem                                                                            | Infecção abdominal, infecções de pele e partes moles, pneumonia, infecções no sistema nervoso central, infecção no trato urinário, infecção ginecológica                                                                                                                                                        |
| Macrolídeos   | Eritromicina, Claritromicina,<br>Azitromicina, Eritromicina, entre<br>outros                                                 | Infecções do trato respiratório por streptococos do grupo A, pneumonia por <i>S. pneumoniae</i> , prevenção de endocardite após procedimento odontológico, infecções superficiais de pele ( <i>Streptococcus pyogenes</i> ), profilaxia de febre reumática (faringite estreptocócica), alternativa para sífilis |
| Quinolonas    | Ciprofloxacina, Levofloxacina,<br>Gatifloxacina, Moxifloxacina,<br>Gemifloxacina                                             | Trato genito-urinário, trato gastrointestinal, trato respiratório, osteomielites, partes moles, ação contra micobactérias                                                                                                                                                                                       |
| Sulfonamidas  | Sulfanilamida, Sulfisoxazol,<br>Sulfacetamida, Sulfadiazina,<br>Sulfametoxazol, Cotrimoxazol<br>(sulfametoxazol+trimetoprim) | Infecções no trato urinário, altas e baixas, uretrites e prostatites agudas ou crônicas, toxoplasmose, otite média, sinusite e exacerbação aguda de bronquite crônica, entre outros                                                                                                                             |
| Tetraciclina  | Doxiciclina, Eravaciclina                                                                                                    | infecções causadas por clamídias, riquetsias, cólera, brucelose e actinomicose, infecções ( <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>H. ducreyi</i> , <i>Treponema pallidum</i> ), traqueobronquites e sinusites                                                                               |

Fonte: ANVISA (2007).

Segundo Tortora *et al.* (2005), a ação dos antibióticos é dirigida a alvos particulares nos microrganismos, podendo ser: i) inibição da síntese da parede celular; ii) inibição da síntese proteica; iii) inibição de ácidos nucleicos; e iv) alteração da permeabilidade celular.

De acordo o relatório estatístico publicado em 2018, pela Organização Mundial da Saúde no documento *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption*, no Brasil, o consumo de antibióticos no ano de 2016 foi de 22,8 doses diárias definidas (DDD), sendo a maior dose ao se comparar com outros países das américas. Os antibióticos mais consumidos entre 2015 e 2016 foram das classes: β-lactâmicos (13,8 DDD/hab/d), macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (3,5 DDD/hab/d), quinolonas (2,6 DDD/hab/d), sulfonamidas e trimetoprim (1,2 DDD/hab/d) e tetraciclinas (0,9 DDD/hab/d). Tal relatório é de extrema importância para uma melhor vigilância padronizada acerca do consumo de fármacos em nível mundial,

principalmente porque é verificado que, em muitos países, essa vigilância é inexistente (WHO, 2018).

### 3.2.1 O aumento no consumo de antibióticos no decorrer dos anos e perante a pandemia da COVID-19

Em dezembro de 2019, ocorreu um surto de pneumonia desconhecida em Wuhan na China (UZUNIAN & WANH, 2020), uma infecção oriunda da presença do vírus SARS-CoV-2, espalhando para o restante dos países ao redor do mundo. Posteriormente, foi declarada a pandemia do COVID-19 e, devido a isso, foi relatado um uso indiscriminado e inadequado dos antibióticos e outros medicamentos em alguns países. Neste contexto, muitas pesquisas abordaram o aumento no consumo de específicos medicamentos. O aumento no consumo de azitromicina, por exemplo, foi reportado em vários países que avaliaram seu uso em ambiente hospitalar, em meados do primeiro e segundo semestres de 2020 (CASTRO-LOPES & CORREIA, 2021; GRAU *et al.*, 2021; GRAU & HERNÁNDEZ, 2021; SULIS *et al.*, 2021).

Del Fiol *et al.* (2022) reuniram dados importantes em sua pesquisa, acerca das vendas de antibióticos no período da pandemia, sendo relatado que, entre janeiro de 2014 a julho de 2021, cerca de 800 milhões de pacotes com antibióticos foram vendidos em farmácias no Brasil. Entre aqueles que mais foram vendidos, estão os antibióticos amoxicilina, azitromicina e cefalexina, contabilizando 67% das vendas. No período da pandemia, as vendas destes três antibióticos mostraram uma diferença estatística significativa quando comparados com anos anteriores. Do ano de 2014 a 2016, azitromicina era consumida em maior quantidade em relação à amoxicilina. Esse consumo foi igualado entre os anos de 2017 e 2018 e, no ano de 2019, amoxicilina estava sendo mais consumida. O consumo de azitromicina aumentou significativamente durante a pandemia (5,8% por mês, especialmente no início da pandemia), enquanto amoxicilina e cefalexina mostraram uma diminuição. Entre fevereiro/2020 e julho/2020, as vendas de azitromicina aumentaram de 1,40 DDD/1.000hab/d para 3,53 DDD/1.000hab/d, continuando a crescer até janeiro/2021.

Wang *et al.* (2020) mostraram que a concentração de antibióticos em estações de tratamento de esgotos, na Ásia, Europa, América do Norte e África, com perfis variados. As classes mais encontradas foram sulfonamidas, macrolídeos, trimetoprim

e quinolonas, com abundância tanto nos afluentes quanto nos efluentes. Além destas, outras classes de antibióticos como tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos e lincomicina também foram detectadas.

A OMS também divulgou dados mais recentes acerca do panorama mundial em relação ao consumo de antibióticos e a resistência antimicrobiana. Em 2015, foi estabelecido o Sistema Global de Resistência Antimicrobiana e Uso de Vigilância (GLASS – *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*), com o intuito de se realizar um monitoramento de RA em bactérias mais comuns e alguns fungos invasivos, além do consumo de antibióticos entre os humanos. Até o final de 2021, cerca de 109 países e mais 2 territórios e áreas estavam envolvidos no GLASS e vários países, territórios e áreas (PTAs) estavam contribuindo para o monitoramento adequado. Todavia, em 2020, com a pandemia da Covid-19, alguns PTAs não puderam fornecer dados.

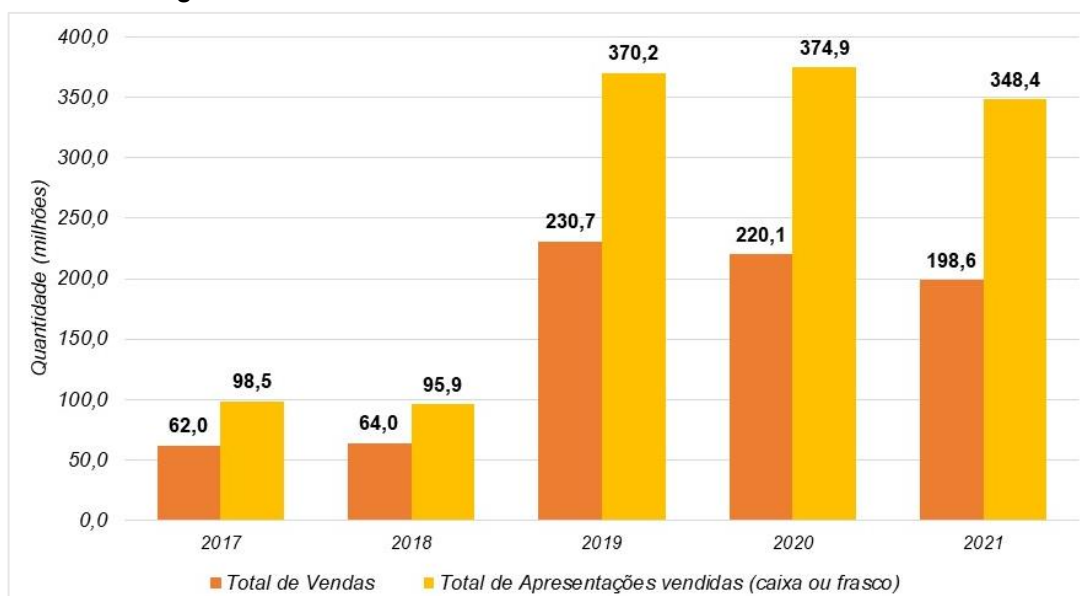
No ano de 2022, através das informações divulgadas no documento *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022*, pôde-se avaliar um pouco da tendência para a RA e o consumo de antibióticos ao redor do mundo. Para 2020, o valor mediano total de antibióticos consumidos foi de 16,6 DDD/1.000hab/d (variou de 12,3 a 31,2), incluindo informações de 26 PTAs. Foram observados pela OMS valores altos na África (15,3 DDD/1.000hab/d, variando de 3,6 a 58,2), no sudeste Asiático e algumas regiões do Pacífico Ocidental (15,3 DDD/1.000hab/d, variando de 9,5 a 57,4). Na região do Mediterrâneo Oriental, todas as PTAs relataram consumos maiores que 29,0 DDD/1.000hab/d (mediana de 31,8, variando 29,4 a 53,6), enquanto seis PTAs da Europa obtiveram um valor mediano igual a 15,3 DDD/1.000hab/d (variou de 9,2 a 30). Somente dois países das Américas participaram, com dados de antibacterianos para uso sistêmico, sendo estes Colômbia e Peru (reportado somente do setor público), cujos valores medianos foram de 22,5 e 12,5 DDD/1.000hab/d, aproximadamente.

No documento, a OMS afirma que houve variações entre a distribuição dos antibióticos, investigando-se cerca de 26 substâncias. As penicilinas  $\beta$ -lactâmicas foram os subgrupos de maior consumo (7,1 DDD/1.000hab/d), representando cerca de 34% do consumo total, variando entre 4% na República Unida da Tanzânia a 72%

no Gabão. O consumo médio de macrolídeos/lincosamidas/estreptograminas foi de 2,2 DDD/1.000hab/d, cujo maior consumo se deu nos países da Etiópia (38%), Irã (26%) e Nepal (27%). As classes de quinolonas e tetraciclina obtiveram consumo médio de aproximadamente 1,6 DDD/1.000hab/d, equivalendo a 11% e 9%. Em 12 PTAs, a amoxicilina foi a mais consumida (consumo relativo mediano de 19%, representando 46% entre os PTAs mencionados), fazendo parte da lista de medicamentos antibacterianos orais e parenterais que compreendem 75% do consumo total de antibacterianos (DU75) de 24 PTAs relatados. Outras substâncias incluídas no DU75 oral, em mais de 40% dos PTAs, foram ciprofloxacina, azitromicina, doxiciclina e metronidazol. Países como Brasil, Canadá e Estados Unidos não forneceram dados no ano de 2020 (WHO, 2022).

Em nível nacional, é possível analisar os dados de vendas de medicamentos, que são enviados por farmácias e drogarias privadas do Brasil, que registram as informações no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) e são enviados para a ANVISA. A Figura 1 traz um histórico do total de vendas de medicamentos industrializados e o total de apresentações vendidas (caixa ou frasco), dos anos de 2017 a 2021.

**Figura 1 – Histórico de venda de medicamentos de 2017 a 2021**



Fonte: ANVISA (2023).

Diante disso, observa-se que, no ano de 2019, houve um aumento no total de vendas de 166,8 milhões. Além disso, o total de apresentações vendidas (caixa ou frasco) também aumentou exorbitantemente, sendo este igual a 274,2 milhões.

Ademais, através do estudo de Melo *et al.* (2021), foi possível constatar, também, o aumento nas vendas de determinados medicamentos. No caso, através da consulta de dados do Sistema Nacional em Gestão de Produtos Controlados (SNGPC), feita pelos autores, foi mostrado que as vendas de azitromicina durante a pandemia aumentaram 30,8%. Em 2019, eram vendidas cerca de 12 milhões de caixas do antibiótico, já em 2020, esse número aumentou para mais de 16 milhões.

No sul do Brasil, também foram reportados antibióticos de algumas destas classes em amostras de rios urbanos que recebem efluentes domésticos, em Porto Alegre. Em todos os pontos de amostragem foram detectados antibióticos das classes  $\beta$ -lactâmicos (cefalexina), quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), macrolídeos (azitromicina e clindamicina), sulfonamidas (sulfadiazina e sulfametoxazol) e trimetoprim. Cefalexina foi encontrada em concentrações superiores ao se comparar com países da China e as maiores concentrações de antibióticos foram nos pontos situados na área urbana (ARSAND *et al.*, 2020).

Em amostras de rios coletadas em Curitiba, Böger *et al.* (2021) observaram a quantificação de alguns antibióticos e, entre eles, encontrou amoxicilina em todas as amostras, sendo o antibiótico com maiores concentrações ao se comparar com o restante (0,18  $\mu\text{g/L}$  a 4,63  $\mu\text{g/L}$ ). Azitromicina também foi detectada (0,08  $\mu\text{g/L}$  a 0,65  $\mu\text{g/L}$ ), sendo o segundo antibiótico em maior quantidade, no geral. Em um dos pontos amostrais, sulfametoxazol foi mencionado tendo a segunda maior concentração (1,32  $\mu\text{g/L}$ ). Comparando-se os resultados com estudos em esgotos, os autores mencionam concentrações similares, indicando que os rios possuem alta contaminação por efluentes domésticos.

Antibióticos e seus metabólitos, após o consumo e metabolização, são excretados por seres humanos e animais, estando abundantemente presentes nas águas residuárias e estações de tratamento de esgoto. São amplamente detectados em esgotos, águas subterrâneas e superficiais, lodo de esgoto, solo e fezes em diferentes pesquisas ao redor do mundo. Uma das preocupações acerca destas substâncias se dá pelo seu

consumo exacerbado e sua disseminação pelo ambiente, podendo favorecer a transferência horizontal de genes, provocando pressão seletiva (KÜMMERER, 2009; CHEN, *et al.*, 2017; BINH *et al.*, 2018). Além disso, os antibióticos são considerados contaminantes de preocupação emergente por possuírem efeitos adversos no ecossistema e nos seres humanos (XU *et al.*, 2016).

Como comentado, são encontrados em diversos ambientes e continuam a ser descartados e direcionados para os corpos d'água. Logo, mesmo sendo considerados como biodegradáveis, são detectados frequentemente em inúmeros ambientes distintos, estando também associado ao aumento na prevalência da resistência aos antibióticos (RIZZO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Síntese e panorama dos casos de COVID-19 no Brasil

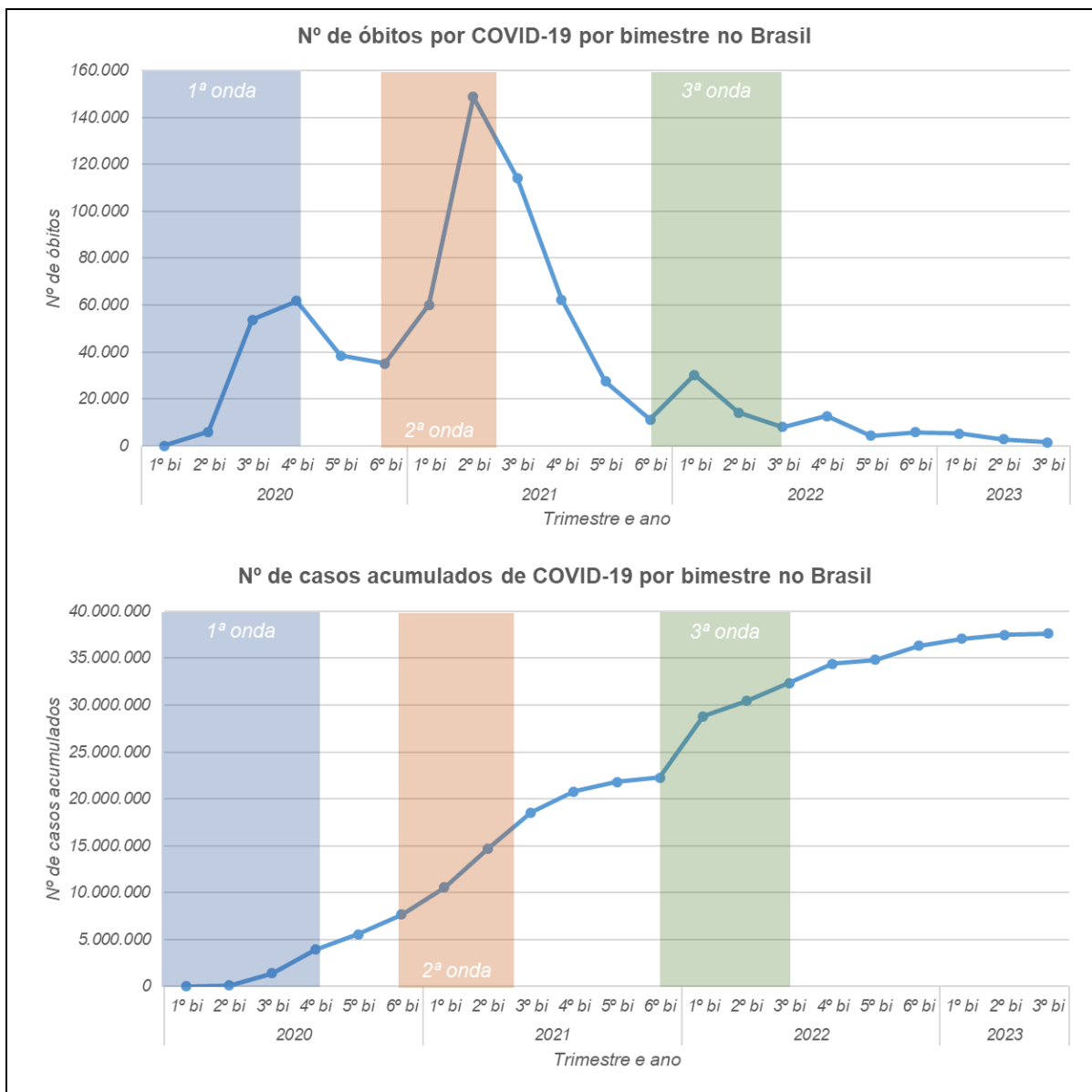
Conforme comentado anteriormente, no dia 31 de dezembro de 2019, um novo tipo de coronavírus não identificada anteriormente em seres humanos começou a circular na cidade de Wuhan, na China. O coronavírus responsável por causar a doença COVID-19 é nomeado como SARS-CoV-2 e, já em 30 de janeiro de 2020, a OMS constituiu uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), sendo um evento que pode constituir um risco de saúde pública, de forma a promover uma resposta internacional coordenada e imediata. Já em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi considerada como uma pandemia por parte da OMS (OPAS, 2023).

Até 14 de junho de 2023, houve 767.984.989 de números de casos confirmados (acumulados), que foram reportados, em nível mundial. Além disso, a doença levou a cerca de 6.943.390 óbitos. O maior número de casos confirmados reportados se deu no continente europeu, seguido pela região do Pacífico Ocidental e pela região das Américas. Já em relação ao número de óbitos até a data mencionada, a região das Américas está em primeiro lugar, enquanto a Europa segue em segundo lugar e, em terceiro, o Sudeste Asiático (WHO, 2023).

No Brasil, o Ministério da Saúde criou o Painel Coronavírus, com o intuito de disponibilizar as informações sobre a doença, colocando os números de casos e de óbitos em todo o país. Até o dia 09 de junho de 2023, a contagem de casos acumulados chegou a 37.639.324, enquanto o número de óbitos no país era igual a

703.291. A Figura 2 traz o panorama nacional em relação à COVID-19, tanto para o número de casos acumulados quanto para o número de óbitos (novos).

Figura 2 – Panorama nacional para nº de óbitos por COVID-19 e nº de casos acumulados, por bimestre



Data da 1ª onda: 23/01/2020 a 25/07/2020; data da 2ª onda: 08/11/2020 a 10/04/2021; data da 3ª onda: 26/12/2021 a 21/05/2022 (MOURA et al., 2022).

Fonte: Ministério da Saúde (2023).

Através dos gráficos, é possível perceber o momento dos picos para o número de mortes pela doença, de forma a evidenciar claramente as três ondas de óbitos. Para melhor visualização, os dados foram dispostos por bimestre.

### 3.3 Resistência antimicrobiana

Segundo a OMS, a resistência antimicrobiana (RAM) acontece quando bactérias, vírus, fungos e parasitas não respondem mais aos medicamentos, o que dificulta o tratamento e aumenta o risco de propagação da doença, doenças graves e morte. Neste contexto, surgem patógenos que adquirem novos mecanismos de resistência, que são disseminados rapidamente pelo ambiente e ameaçam o tratamento de infecções comuns com os antimicrobianos existentes (WHO, 2014).

#### 3.3.1 Bactérias resistentes a antibióticos e mecanismos de resistência

No caso das bactérias resistentes, ao serem submetidas a condições de estresse e/ou pressão seletiva, como ambientes ricos em metais ou resíduos de antibióticos, podem obter mecanismos de resistência a fim de adaptarem contra esses efeitos. Isso pode ocorrer por meio de: i) mutações; ii) aquisição de genes de resistência a antibióticos (GRAs), através de transferência vertical de genes (célula mãe para célula filha); iii) transferência horizontal de genes (entre bactérias até mesmo de gêneros distintos); e iv) por meio de infecções por vírus, que podem carrear genes de resistência, aumentando esta transferência para bactérias hospedeiras. Além disso, estes elementos de resistência persistem tanto nos ambientes aquáticos quanto no solo, possuindo rápida proliferação e disseminação no meio ambiente, o que pode acarretar prejuízos entre animais e seres humanos. As bactérias resistentes, por sua vez, também são capazes de sobreviver por um longo período de tempo nestes diversos ambientes (WHO, 2014). Esta resistência pode ser dividida em: resistência intrínseca ou natural e resistência adquirida.

A resistência intrínseca ou natural é a resistência das bactérias à ação de um antibiótico específico devido a alguma característica estrutural ou funcional inerente da espécie, não estando associada ao uso dos antibióticos, mas sim, associada à estrutura da bactéria (BLAIR *et al.*, 2015; KADHUM & HASAN, 2019). No nucleóide da bactéria estão inseridos os genes que conferem esta característica, correspondendo aos genes essenciais contidos no cromossomo. Ou seja, são características naturais e fenotípicas da espécie, sendo transferida hereditariamente, conhecida como transferência vertical (DEL FIO *et al.*, 2000). Devido ao fato de se conhecer as particularidades do patógeno e dos fármacos que podem atuar sobre



estes, este tipo de resistência pode ser previsto (O'NEILL, 2016). A Tabela 2 mostra alguns exemplos de resistência natural.

**Tabela 2 – Resistência intrínseca de algumas bactérias na presença de específicos antibióticos**

| <b>Microrganismo</b>                                                | <b>Antibiótico</b>                                                    | <b>Mecanismo de resistência intrínseco</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bactérias estritamente anaeróbias                                   | Aminoglicosídeos                                                      | Incapacidade de atravessar a membrana interna, que se caracteriza por um processo dependente de oxigênio. A resistência ocorre, pois, estas bactérias carecem do transporte adequado à entrada do antibiótico. As bactérias aeróbias facultativas só apresentam resistência quando crescem em condições de anaerobiose (FLUIT, VISSER & SCHMITZ, 2001) |
| Bacilos Gram negativos                                              | Macrolídeos<br>Lincosamida<br>Estreptogamia B (MLS <sub>B</sub> )     | Diminuição da permeabilidade na membrana externa aos compostos hidrofóbicos (FLUIT, VISSER & SCHMITZ, 2001)                                                                                                                                                                                                                                            |
| Enterococos                                                         | Aminoglicosídeos                                                      | Diminuição do metabolismo oxidativo para que ocorra a entrada do antibiótico                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                                                     | Cefalosporinas                                                        | Decréscimo de PBPs e a produção de $\beta$ -lactamases. (RICE & BONOMO, 2005)                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Escherichia coli</i>                                             | $\beta$ -lactâmicos<br>Tetraciclina<br>Ciprofloxacina<br>Eritromicina | Produção de $\beta$ -lactamases                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Gram positivos                                                      | Aztreonam                                                             | Baixo número de proteínas de ligação a penicilinas (PBPs) onde se dá a ligação do antibiótico                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Gram positivos ( <i>Lactobacilli sp.</i> e <i>Leuconostoc sp.</i> ) | Vancomicina                                                           | Redução do alvo na parede celular impedindo a entrada do antibiótico                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>Mycoplasma sp.</i>                                               | $\beta$ -lactâmicos                                                   | Ausência de parede celular, onde atua o antibiótico (PÉREZ, 2012)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Klebsiella sp.</i>                                               | Ampicilina                                                            | Deve-se à produção de $\beta$ -lactamases, que inativam o antibiótico                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>                                 | Imipenem                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                       | Sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol               | Diminuição da entrada do antibiótico, levando a concentrações intracelulares muito baixas                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                                     | Macrolídeos                                                           | A membrana externa destas bactérias apresenta uma baixa permeabilidade a substâncias hidrofóbicas (PÉREZ, 2012)                                                                                                                                                                                                                                        |

Fonte: Michigan State University (2011); BAPTISTA (2013) (adaptado).

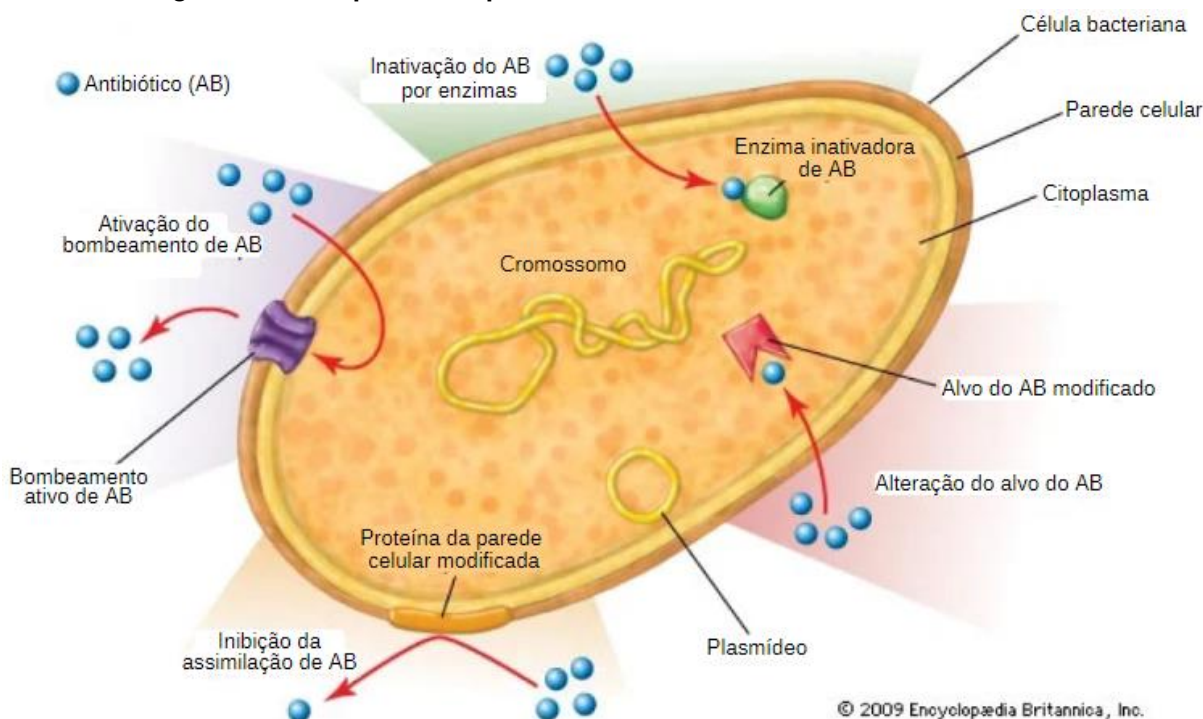
Já a resistência adquirida acontece quando as alterações genéticas cromossômicas e/ou extracromossômicas causam modificações estruturais e/ou bioquímicas na célula bacteriana. Pode acontecer na duplicação celular ou com uma indução por agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio e aquisição de material genético exógeno, através de bacteriófagos (transdução), plasmídeos conjugativos (conjugação) e incorporação de DNA que se encontra livre (transformação). (DEL FIO *et al.*, 2000; BAPTISTA, 2013; DA COSTA, 2016)

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos são: i) modificação de proteínas da parede celular; ii) inativação enzimática do antibiótico; iii) alteração do

local de ação do antibiótico; iv) bombas de efluxo; v) alteração da permeabilidade da membrana; e vi) formação de biofilmes (MADIGAN *et al.*, 2016).

A Figura 3 traz exemplos dos tipos de mecanismos de resistência bacteriana.

**Figura 3 – Exemplos dos tipos de mecanismos de resistência bacteriana**



Fonte: Adaptado de Enciclopédia Britânica (2009).

Como mostrado, o desenvolvimento da resistência bacteriana é um processo evolutivo que ocorre naturalmente. Todavia, este fenômeno está sendo acelerado e intensificado por conta da pressão seletiva que acontece devido ao uso generalizado de drogas antimicrobianas (O'NEILL, 2016; WHO, 2014).

### 3.3.2 Genes de resistência a antibióticos e elementos genéticos móveis

Todas as formas de vida contêm genes, que, por sua vez, são unidades funcionais onde se encontram as informações genéticas, estando localizados em cromossomos ou em outras moléculas grandes, chamadas de elementos genéticos (MADIGAN *et al.*, 2016). Logo, um gene pode ser classificado como uma sequência química particular de ácidos nucleicos. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), que são polímeros constituídos por cadeias de nucleotídeos (YOUSSEF *et al.*, 2019). Um genoma, por

sua vez, de acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (INS) é “o conjunto completo de DNA de um organismo, incluindo todos os genes, que contém todas as informações necessárias para construir e manter esse organismo” (NIH, 2017).

Os genes de resistência a antibióticos são definidos pela expressão dos genes em uma célula bacteriana que pode acarretar diferentes processos metabólicos, como aqueles relacionados ao caráter de resistência (alteração da permeabilidade celular, degradação do antibiótico, extrusão do fármaco e alteração enzimática, por exemplo) (VAN HOEK *et al.*, 2011).

A informação genética pode ser passada através da transferência vertical de genes (TVG) ou transferência horizontal de genes (THG). Na transferência vertical, os genes são passados para suas gerações, visto que os genes essenciais estão localizados no cromossomo bacteriano para suas gerações, inseridos no nucleóide da bactéria. Na transferência horizontal de genes (THG), estes são movidos entre espécies diferentes (ou células), através dos elementos genéticos móveis (EGMs), pelos processos de transformação, conjugação ou transdução (YOUSSEF *et al.*, 2019; MADIGAN *et al.*, 2016).

A transferência horizontal de genes de resistência à antibióticos para outras espécies de bactérias se dá principalmente por meio dos elementos genéticos móveis (GUO *et al.*, 2017; STOKES & GILLINGS, 2011). Os EGMs são estruturas de DNA, na maioria das vezes, contendo material genético que são responsáveis por codificar enzimas e outras proteínas, de forma a regular o movimento de material genético, tanto dentro do genoma quanto entre as células bacterianas (MADIGAN *et al.*, 2016). Podem ser intercelulares, que se movem de uma célula para outra (plasmídeos e bacteriófagos) ou intracelulares, que são aqueles que não podem se auto transferir, mas utilizam os elementos do primeiro grupo para se moverem (*transposons*, *integrons* ou cassetes gênicos). Logo, é através dessa transferência de genes que se tem o carregamento de variadas características, inclusive a resistência a antibióticos ou a produção de toxinas. (MADIGAN *et al.*, 2016; MANAIA, 2017)

Plasmídeos são elementos genéticos constituídos, em sua maioria, por DNA de fita dupla, podendo ser tanto linear quanto circular, que se replicam independentemente

do cromossomo. Os plasmídeos não possuem uma forma extracelular, de maneira a existirem na célula como DNA livre. Neles se encontram genes que conferem específicas propriedades especiais à célula, como um metabolismo diferenciado, resistência a antibióticos ou resistência à metais. Normalmente, são muito menores que os cromossomos. Inúmeros genes de resistência a antibióticos podem ser codificados por um único plasmídeo de resistência (*plasmídeos R*), que podem conferir a resistência ou vários outros inibidores de crescimento (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os *transposons*, por sua vez, são formas de DNA móvel que possuem a capacidade de locomoção entre as diferentes moléculas de DNA do hospedeiro, como cromossomos, plasmídeos e vírus, através da atividade da enzima *transposase*. Dessa forma, atuam transferindo horizontalmente genes com características específicas, como é o caso da resistência aos antibióticos ou produção de toxinas. A maior parte dos *transposons* mais estudados possui genes de resistência a antibióticos como marcadores selecionáveis (MADIGAN *et al.*, 2016).

Já os *integrans* são unidades genéticas caracterizadas pela capacidade de capturar elementos genéticos móveis, que são conhecidos como cassetes gênicos, através de um processo de recombinação sítio-específica, conseguindo também transmutá-los e expressá-los em genes funcionais. São classificados conforme as sequências de aminoácidos da proteína IntI e as classes mais conhecidas são aquelas relacionadas à transferência horizontal dos GRAs, sendo elas classes 1, 2 e 3 (GILLINGS, 2017; GATICA *et al.*, 2015).

Estas unidades genéticas são consideradas como fatores de importância na contribuição para a evolução e aquisição de resistência bacteriana, porque conseguem reunir genes responsáveis por conceder fenótipos de adaptação, sendo encontrados abundantemente em ecossistemas antropogênicos com exposição prolongada a agentes seletivos, como antibióticos, metais pesados e outros recalcitrantes. Os *integrans* de classe 1 (*int1*) são os maiores contribuintes para a disseminação da resistência aos antibióticos e as atividades humanas também promovem sua disseminação e diversificação, servindo como indicadores de poluição

antropogênica e do nível de resistência a antibióticos (GILLINGS, 2017; GATICA *et al.*, 2015).

Várias pesquisas relatam que os processos de tratamento não reduzem de forma eficaz a abundância de *int1*, especialmente devido à maior seleção imposta por metais e antibióticos presentes nos esgotos (BEN *et al.*, 2017; MAKOWSKA *et al.*, 2016). Esses fatores fazem com que esses elementos passem a ser, cada vez mais, alvos importantes para o desenvolvimento de pesquisas entre os cientistas e pesquisadores ao redor do mundo, em relação a estes *integrans* mencionados, visto que seu monitoramento permite a avaliação da contaminação ambiental, assim como a eficiência de remoção nos sistemas de tratamento.

- GRAs e elementos genéticos móveis em esgotos sanitários

As atividades humanas contribuem significativamente para o aumento da resistência antimicrobiana no ambiente, especialmente em corpos d'água, sedimentos, solos e estações de tratamento de esgoto. As ETEs têm sido consideradas como *hotspots* de disseminação da resistência antimicrobiana, e inúmeros organismos resistentes a antibióticos são encontrados em corpos hídricos, sedimentos e efluentes de ETEs (PAZDA *et al.*, 2019; MANAIA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020; KARKMAN *et al.*, 2018)

Estudos mencionam que as ETEs favorecem significativamente a seleção e a dissipação da resistência, por meio dos elementos genéticos móveis e transferência horizontal de genes. O favorecimento para a disseminação da resistência antimicrobiana ocorre por conta das condições ambientais desses locais, que são ricos em nutrientes, sendo ideais para a sobrevivência e propagação destes microrganismos (MACHADO *et al.*, 2022; MANAIA *et al.*, 2018; KRÜMMER, 2009; RIZZO *et al.*, 2013).

A Tabela 3 mostra informações sobre os principais elementos genéticos de interesse que são examinados em estudos cujo ambiente engloba estações de tratamento de esgoto, correlacionados com os patógenos humanos e doenças que são associadas a estes organismos. Além disso, resumidamente, mostra as características gerais dos GRAs como, por exemplo, mecanismo de ação, localização do gene e o antibiótico ao qual a resistência é atribuída.

**Tabela 3 – Principais elementos genéticos de interesse em estudos relacionados ao tratamento de esgoto e patógenos humanos**

| <b>Gene</b> | <b>Características gerais</b>                                                                                       | <b>Localização</b>                         | <b>Antibiótico</b>             | <b>Bactéria/ patógeno associado</b>                                                                                                               | <b>Doença associada</b>                                                    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <i>int1</i> | Facilita a aquisição e disseminação de cassetes gênicos; conduz a expressão de múltiplos GRAs.                      | Cromossomo<br>Plasmídeo                    | –                              | Principalmente Gram-negativas, em especial <i>Escherichia coli</i> multirresistente                                                               | –                                                                          |
| <i>bla</i>  | Codifica β-lactamases que hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro com uma cadeia lateral oximino.               | Cromossomo<br>Plasmídeo                    | β-lactâmicos de amplo espectro | Gram-negativas, em especial Enterobacteriaceae                                                                                                    | Tratos respiratório e urinário; pele                                       |
| <i>tet</i>  | Mecanismo de bombas de efluxo dependentes de prótons ou via proteção ribossômica.                                   | Cromossomo<br>Plasmídeo                    | Tetraciclina                   | Enterobacteriaceae, <i>Campylobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Mycobacterium</i>              | Clamídias; riquetsias; cólera; brucelose; actinomicose                     |
| <i>sul</i>  | Codifica a dihidropteroato sintase, diminuindo a afinidade pela droga.                                              | Cromossomo<br>Plasmídeo<br><i>Integron</i> | Sulfonamidas                   | <i>Acinetobacter</i> , Enterobacteriaceae, <i>Bacillus</i>                                                                                        | Tratos respiratório e urinário; toxoplasmose                               |
| <i>erm</i>  | Codifica rRNA adenina N-6-metiltransferase que ocasiona redução da afinidade entre ribossomos e antibióticos.       | Cromossomo<br>Plasmídeo                    | Macrolídeos                    | <i>Mycoplasma</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Treponema</i> | Conjuntivite; infecções pélvicas; coqueluche; faringite não estreptocócica |
| <i>qnr</i>  | Codifica proteína pentapeptídeo que protege a DNA girase e topoisomerase IV da ação inibitória de fluoroquinolonas. | Cromossomo<br>Plasmídeo                    | Quinolonas                     | <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Shewanella</i> , Enterobacteriaceae                                             | Tratos genito-urinário, gastrointestinal e respiratório; osteomielites     |

Fonte: ASHBOLT *et al.*, 2018; PÉREZ-VALDESPINO *et al.*, 2016 *apud* FREITAS, 2020.

Os genes de resistência aos antibióticos são categorizados em classes (em alguns casos, subclasses) distintas, diante das características que lhe são atribuídas, como a tipologia do antibiótico do qual os genes passam a ser resistentes, o mecanismo de resistência apresentado e o grupo microbiano que os possui. De acordo com suas propriedades bioquímicas (enzimática e de transportadores) ou por diferenças nas sequências gênicas, as classes de GRAs passam a ser categorizados em subclasses (MUNITA & ARIAS, 2016). Sendo assim, existem diversos estudos que quantificam inúmeros elementos genéticos com o intuito de se investigar a maior parte do resistoma destes ambientes, principalmente em função da grande diversidade de classes e subclasses de GRAs que são encontrados em esgotos sanitários.

### 3.4 Resistência a antibióticos (RA) no ambiente

No documento *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022* publicado pela OMS, foi observado aumento significativo nas taxas de RA a alguns antibióticos em mais de 15% em 2020, quando comparado com 2017. Esse aumento foi para *E. coli* resistente à meropenem e cefalosporinas de terceira geração, causadas por infecções bacteriologicamente confirmadas (IBCs) da corrente sanguínea, *Salmonella spp.* resistente à ciprofloxacina causadas por IBCs da corrente sanguínea; e resistência à azitromicina em IBCs de gonorréia (WHO, 2022).

Entre os anos de 2016 e 2020, o número médio de IBCs com teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA), por milhão da população, aumentou em 58% para infecções do sistema sanguíneo (50,5% em 2016 e 79,9% em 2020), mas diminuiu para 43% para as infecções gastrointestinais (7,7% em 2016 e 4,4% em 2020) e diminuiu para 88% em infecções no trato urinário. A OMS declara que o alto índice de RA em patógenos que causam infecções na corrente sanguínea é alarmante. *Klebsiella pneumoniae* é o terceiro maior patógeno causador de infecções sanguíneas e foram notados altos índices de resistência destes microrganismos à cefalosporinas de terceira geração. Além disso, outra questão alarmante é a disseminação de bactérias da ordem Enterobacterales que são capazes de produzir *carbapenemase*, e os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos em *Acinetobacter spp.* (WHO, 2022).

A água e sua qualidade são de extrema importância para a proteção ambiental e a garantia da saúde pública. Com o auxílio dos microrganismos, as águas residuárias e cursos d'água altamente poluídos podem ser purificados, levando, posteriormente, a sua possível reutilização. Além disso, sabe-se que é através dos cursos d'água que muitas doenças transmissíveis e patógenos, como bactérias, vírus e/ou protistas parasitas, podem chegar aos diversos ambientes, mesmo quando estes patógenos estão em pequenas quantidades. Com isso, a falta de tratamento ou tratamento inadequado se tornam um perigo, tanto para os animais quanto para os seres humanos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os antibióticos alcançam o ambiente por meio de diversas fontes, sendo direcionados para as estações de tratamento de esgoto através de fezes humanas e animais seja

pela sua forma original ou por seus metabólitos, além dos descartes excessivos destes componentes em esgotos domésticos e hospitalares, companhias farmacêuticas, produção de alimentos de origem animal e aquacultura (GÖBEL *et al.*, 2005 & BÖRJESSON, 2009 & CHARLOTTE, 2015 *apud* NNADOZIE *et al.*, 2017).

Com o intuito de se avaliar a disseminação da resistência a antimicrobianos e microrganismos patogênicos nos ambientes em geral, além de se investigar os riscos de sua transmissão aos seres humanos e animais, o ciclo hidrológico urbano (e parte do rural) tem destaque significativo. Este ciclo compreende a captação, tratamento/desinfecção e distribuição de água para consumo, além da coleta, tratamento e despejo de águas residuais (inclusive a possibilidade de aproveitamento do efluente tratado para a agricultura), que são direcionados para o meio ambiente (MAIANA *et al.*, 2016).

Coutinho *et al.* (2014) investigou amostras de ambientes aquáticos, como rios, água do mar e água salobra de um sistema de manguezais, além de amostras de locais com maior fluxo de atividades antrópicas, no Rio de Janeiro (Brasil). Foram isolados e identificados organismos que apresentaram multirresistência a mais de três antibióticos, como *Enterococcus gallinarum*, *P. aeruginosa* e *Vibrio fluvialis*, além de terem sido identificados patógenos resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, como *P. aeruginosa*, *Shigella sp.* e *V. cholerae*. *K. pneumoniae* se mostrou resistente a três antibióticos e bactérias resistentes à ampicilina estiveram presentes nos ambientes mais impactados pelas atividades humanas (*Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Klebsiella sp.*, por exemplo).

Em Porto Alegre (Brasil), também em amostras de rios, foi verificada a presença de algumas classes de antibióticos, como  $\beta$ -lactâmicos (cefalexina), quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), macrolídeos (azitromicina e clindamicina), sulfonamidas (sulfadiazina e sulfametoxazol) e trimetoprim, por Arsand *et al.* (2020). As maiores concentrações de antibióticos foram encontradas na área urbana, sendo a classe de quinolonas em maior abundância. Houve a investigação dos genes de resistência às sulfonamidas (*sul1*),  $\beta$ -lactâmicos (*blaTEM*), eritromicina (*ermB*) e quinolonas (*qnrS*). O GRA encontrado em maior concentração foi o *blaTEM*, quando comparado aos outros genes. A presença do gene *qnrS*, juntamente com a alta



concentração de quinolonas, mostram-se como uma ameaça à saúde humana, visto que a resistência, que é mediana por plasmídeos, pode ser propagada com a maior promoção de seleção de mecanismos de resistência.

Esses estudos comprovam que as atividades antrópicas levam a uma deterioração da qualidade e principalmente ao aumento na ocorrência de antibióticos e elementos de resistência, como GRAs e BRAs, fazendo com que os corpos d'água, especialmente em ambientes urbanos, possam ser uma fonte e reservatório importantes de elementos de resistência (COUTINHO *et al.*, 2014; ARSAND *et al.*, 2020).

Além disso, nas ETEs, observam-se fatores importantes que influenciam na propagação e destino de resíduos de antibióticos, metais pesados, BRAs e GRAs, como a tipologia do tratamento, que pode ser, por exemplo, tratamento mecânico, biológico, físico, químico ou físico-químico (PAZDA *et al.*, 2019). Mas, mesmo com uma operação ótima, as ETEs podem contribuir para a disseminação de patógenos e resistência antimicrobiana no ambiente (NNADOZIE *et al.*, 2017), visto que este é um local rico em nutrientes e condições ótimas para que essa resistência seja disseminada (PAZDA *et al.*, 2019).

### 3.5 Diversidade microbiana em esgotos sanitários

Diversos são os gêneros e espécies bacterianas resistentes encontradas no esgoto bruto e efluente tratado, principalmente devido aos diferentes tipos de métodos de pesquisa, que podem ser dependentes e independentes de cultivo. Entre os grupos mais encontrados estão as *Proteobactérias*, seguidas de *Actinobacterias*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. (DA SILVA *et al.*, 2016; REINTHALER *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2011).

A OMS publicou, em 2017, uma lista de prioridades globais para bactérias patogênicas resistentes a antibióticos que apresentam ameaça à saúde global, dividindo entre os níveis de importância crítica, alta e média, de maneira a incentivar as pesquisas e o desenvolvimento de novos antibióticos. Tal categorização é composta pelos níveis e bactérias: i) crítico (*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* com resistência a carbapenemases, e *Enterobacteriaceae* com resistência a carbapenemases e cefalosporina de terceira geração), ii) alto (*Enterococcus faecium*

resistente à vancomicina; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e vancomicina; *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina; *Campylobacter* e *Salmonella spp* resistentes a fluoroquinolona; e *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporina de terceira geração e fluoroquinolona) e iii) médio (*Streptococcus pneumonia* não-susceptível a penicilina, *Haemophilus influenza* resistente a ampicilina e *Shigella spp.* resistente a fluoroquinolona) (WHO, 2017).

Levando-se em consideração a lista de prioridades globais, publicada pela OMS, alguns estudos mostram certas bactérias que estão pautadas pela OMS. Na pesquisa feita por Nnadozie *et al.* (2017), inúmeras dessas bactérias são mencionadas. Os autores compilaram dados de pesquisas ao redor do mundo, em esgotos sanitários. Entre as bactérias pertencentes à esta lista, aludidas no artigo, têm-se *Escherichia coli*, *Serratia sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella spp.* e *Shigella flexneri*, membros da família Enterobacteriaceae, e *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae), *Mycobacterium tuberculosis* (Mycobacteriaceae), *Enterococcus faecium* e *Enterococci faecalis* (Enterocacaceae), *Staphylococcus aureus* (Staphylococaceae) e *Vibrio cholerae* (Vibrionaceae), que foram detectados tanto em esgotos brutos quanto em efluentes tratados.

Muitas destas bactérias relatadas neste estudo, também foram detectadas em esgoto bruto e efluente tratado em ETEs da região de Belo Horizonte, por Machado *et al.* (2022), como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococci faecalis*, apresentando resistência a antibióticos e/ou sendo multirresistentes.

Vaz-Moreira *et al.* (2014) mostrou que os grupos bacterianos comumente encontrados em amostras de águas superficiais, águas minerais, águas de consumo não-tratadas, águas de consumo tratadas, esgotos municipais (domésticos e industriais) e esgotos provenientes de produção animal foram *Acidovorax*, *Curvibacter*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Bacillus* e *Clostridium*. Isso mostra que esses organismos são capazes de persistir em vários ambientes, inclusive ETEs municipais. A pesquisa englobou dados publicados entre os anos 1995 e 2013, que foram

realizados em diversos países ao redor do mundo, incluindo técnicas independentes e dependentes de cultivo.

Asfaw *et al.* (2017) estudou a ocorrência de resistência antimicrobiana em esgoto hospitalar e efluente tratado, em um sistema composto por uma unidade de lagoa facultativa, seguida por seis unidades de lagoas de maturação, no norte da Etiópia. A eficiência de remoção encontrada para bactérias heterotróficas totais foi de 99%, aproximadamente. Levando em consideração a contagem de coliformes totais e termotolerantes antes e após o tratamento, percebe-se uma eficiência de remoção também de 99%. Em relação a remoção de *E. coli*, o sistema apresentou eficiência de cerca de 97%. Todavia, as contagens de bactérias patogênicas e potencialmente patogênicas e isolados de bactérias resistentes encontrados ainda são altas e preocupantes. As espécies bacterianas isoladas que foram encontradas com maior frequência foram: *Klebsiella spp* (16,7%) seguida por *S. aureus* (15,5%) e *P. aeruginosa* (14,3%) (em amostras de esgoto bruto), e *Klebsiella spp* (20%). *P. aeruginosa* (16%) e *S. aureus* (16%) (em amostras de esgoto tratado).

Em um compilado de informações de outras pesquisas, Pazda *et al.* (2019) relataram que através dos métodos dependentes de cultivo, as bactérias resistentes mais frequentes nos esgotos pertencem aos indicadores comuns de contaminação fecal, como *E. coli*, coliformes totais e *Enterococcus*. Todavia, outras bactérias clinicamente importantes foram reportadas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilinas, *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina, e bactérias gram-negativas (*Enterobacteria*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*).

No Rio de Janeiro (Brasil), foram identificados diferentes grupos pertencentes ao domínio Bacteria (*Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Espiroquetas*) em amostras de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar. Foi constatado que, entre as 221 bactérias isoladas, o maior grupo apresentou resistência à combinação entre trimetoprim e sulfametoxazol. Através do método de identificação dependente de cultivo, encontraram-se as espécies *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Escherichia spp*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* e *Serratia rubidace*. Os métodos moleculares utilizados não foram capazes de detectar essas espécies de

bactérias, contudo, *Klebsiella variicola* foi identificada pela técnica de clonagem, mas não pelo método de cultura (CHAGAS *et al.*, 2011).

### **3.6 Estações de Tratamento de Esgoto e os elementos de resistência**

As águas residuárias que chegam nas estações de tratamento são constituídas por três fontes principais, que são os esgotos domésticos, provenientes de residências, instituições e comércio, as águas de infiltração e até mesmo despejos industriais. No tratamento de esgotos, tem-se o tratamento preliminar, que é essencial para a retirada dos sólidos grosseiros no momento em que o esgoto chega na estação. Logo depois, tem-se o tratamento primário, que objetiva a remoção de sólidos em suspensão sedimentáveis e matérias orgânicas. No tratamento secundário são utilizados mecanismos biológicos para a retirada de matéria orgânica e alguns nutrientes. Por fim, pode-se ter ainda o tratamento terciário, para a remoção de poluentes específicos, tais como nutrientes, patógenos, metais pesados, entre outros. É importante salientar que nem todas as ETEs são compostas por todos os tipos de tratamento mencionados, principalmente aquelas de menor porte e maior simplicidade do sistema em si (VON SPERLING, 2014; VON SPERLING, 2005).

De acordo com o levantamento publicado pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) através do ATLAS Esgotos – Despoluição de Bacias Hidrográficas, no Brasil, foram identificadas 3.668 ETEs em operação no Brasil, sendo que, entre os processos mais encontrados, tem-se, por exemplo, reatores anaeróbicos de fluxo ascendente (UASB), lagoas anaeróbicas seguidas de lagoas facultativas (Sistema Australiano), reatores anaeróbicos, tanques sépticos associados a filtros anaeróbicos e reatores anaeróbicos seguidos por filtros biológicos (ANA, 2020).

O cenário atual brasileiro para o saneamento ainda é preocupante, visto que é relatado que somente 43% da população possui acesso à coleta de esgoto e tratamento coletivo, enquanto 12% utilizam fossa séptica de forma individual, perfazendo um total de 55% da população em condições adequadas de tratamento. Entre o restante, 18% dos brasileiros dispõem de coleta de esgoto, mas esse esgoto não é tratado, e 27% não desfrutam de coleta e/ou tratamento. Considerando-se esse cenário, diante das estimativas, dentre 9,1 mil toneladas de esgotos sendo gerados por dia, 1,7 mil toneladas de esgotos são coletadas e não são tratados, ao passo que 2,4 mil

toneladas são descartadas a céu aberto, por dia (ANA, 2017). Em outras palavras, existem toneladas de esgoto sendo despejados de maneira inadequada, o que proporciona ainda mais a propagação da resistência antimicrobiana no meio ambiente, além de outras doenças.

Levando em conta dados mais recentes, diante dos relatórios disponibilizados pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2022), para o ano de 2021, cerca de 55,8% da população total brasileira e 64,1% da população urbana possuem atendimento com rede de esgoto (excluso atendimento com sistemas alternativos), enquanto 51,2% do esgoto gerado recebeu algum tipo de tratamento. A maior porcentagem de atendimento total de esgoto é referente à região sudeste, perfazendo 81,7%. Já a região norte tem um índice de 14% de atendimento total de esgoto, sendo a menor porcentagem entre as regiões brasileiras (SNIS, 2022).

Ainda que algumas ETEs sejam capazes de remover algumas dessas BRAs, podem também atuar como fonte de disseminação da resistência antimicrobiana, constituindo um ambiente propício para o aumento destes elementos. Para muitos autores, as diferenças estruturais das ETEs e nos tipos de tratamento influenciam no destino das BRAs nas águas residuárias. Entretanto, outros estudos mostram inconsistências nos resultados, com relação à remoção de GRAs em diferentes tipos de tratamento (LI *et al.*, 2021).

As estações de tratamento de esgotos, por sua vez, atuam como depósitos de resistência antimicrobiana, visto que as águas residuais são fontes de liberação de elementos de resistência nos ambientes aquáticos. Nesses locais, existe a alta disponibilidade de nutrientes, conjuntamente com uma alta densidade celular, o que favorece o aumento da transferência horizontal de genes por meio dos elementos genéticos móveis (IAKOVIDES *et al.*, 2021; MANAIA *et al.*, 2018).

Mesmo que as tecnologias utilizadas nas ETEs reduzam, significativamente, as concentrações de biomassa, ainda se observa níveis altos de antibióticos, patógenos, GRAs e elementos genéticos móveis nos efluentes tratados, que são levados para os corpos receptores e continuam a sobreviver nestes ambientes por longos períodos de tempo (CHU *et al.*, 2017; GATICA *et al.*, 2015, MANAIA *et al.*, 2018). O efluente tratado de maneira ineficiente pode atuar como um portador e espalhar diferentes

patógenos e suas resistências associadas para o meio ambiente (NNADOZIE *et al.*, 2017).

Em algumas pesquisas realizadas na Polônia, foram coletadas amostras em rios onde são descartados efluentes tratados, tanto no local antes do lançamento quanto após o lançamento. Percebeu-se aumento significativo na quantificação e concentração de elementos de resistência, como BRAs, GRAs e EGMs, em amostras posteriores ao descarte de efluente tratado, quando comparados com as quantificações destes elementos em amostras anteriores ao lançamento dos efluentes (OSINSKA *et al.*, 2019; MAKOWSKA *et al.*, 2016). Em um dos estudos, houve aumento de 2 unidades logarítmicas de BRAs após o lançamento do efluente, comparando com os valores encontrados antes do lançamento do efluente (MAKOWSKA *et al.*, 2016).

Ter os dados e estatísticas relacionados a esses elementos é de extrema importância, visto que o efluente tratado é lançado nos corpos d'água, o que pode aumentar a disseminação para os meios aquáticos e solos, aumentando a possibilidade de impacto entre os seres humanos e animais. Ademais, entender o destino desses elementos genéticos de resistência durante os diversos sistemas e processos de tratamento é imprescindível, a fim de que se tenha a melhor prevenção possível em relação a sua liberação nos efluentes e até mesmo para situações de reuso (IAKOVIDES *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2017).

A Diretiva de Tratamento de Águas Residuais Urbanas da União Europeia (UE), adotada em 1991 (*EU Directive 91/271/EEC*), passou por revisões no ano de 2022 com o intuito de se adequar às normas atuais e abordar questões emergentes. Nessa revisão, os objetivos principais foram: reduzir a poluição, melhorar a qualidade da água, promover o acesso ao saneamento e responsabilizar a indústria pelo tratamento de micropoluentes. Além disso, é introduzida a exigência de monitoramento de parâmetros de saúde, incluindo o vírus SARS-CoV-2, em águas residuais urbanas, fornecendo uma ferramenta valiosa para detecção precoce e gestão de pandemias.

Destacou-se, também, a exigência de monitoramento regular da resistência antimicrobiana em estações de tratamento de esgoto. Até 2025, os estados membros da união devem garantir o monitoramento da RAM em estações de tratamento de esgoto para populações maiores que 100.000 habitantes. Com isso, a diretiva

pretende aumentar o conhecimento científico e possibilitar que sejam adotadas medidas adequadas para o futuro (EUROPEAN COMMISSION, 2022). Tais medidas são cruciais para enfrentar a disseminação da RAM, servindo de exemplo para o restante dos países do mundo, que se mostra uma ameaça crescente à saúde pública e ao meio ambiente. O monitoramento contínuo permitirá o desenvolvimento de novas tecnologias de detecção, além de implementação de ações adequadas, resultando em uma melhoria significativa na qualidade dos corpos d'água e na saúde de todos, de forma a promover um ambiente mais saudável para as gerações futuras.

### **3.7 Sistema de lagoas de estabilização**

Em relação ao sistema de tratamento de esgoto estudado neste trabalho, sendo lagoa facultativa seguida por lagoa de maturação, as lagoas são conhecidas por reterem os esgotos por um período de tempo longo o suficiente para que haja o desenvolvimento de processos naturais de estabilização da matéria orgânica. São caracterizadas por seu processo natural de construção, com operação simples e não geram efeitos residuais prejudiciais. A área requerida para sua construção é grande. Além disso, tem-se uma grande quantidade de produção de algas e a atenção para o efluente e os padrões de lançamento são maiores quando comparado a outros tipos de sistemas (VON SPERLING, 2014).

As lagoas podem ser primárias (recebendo efluente bruto) ou secundárias (recebendo efluente de outra unidade de tratamento). O bom desempenho desse sistema é dependente das condições climáticas. Na lagoa facultativa, bactérias facultativas são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica carbonácea (DBO solúvel e finamente particulada); ocorre a nitrificação de matéria orgânica nitrogenada por bactérias; as microalgas produzem oxigênio na camada superior, através da fotossíntese, e há redução da matéria orgânica carbonácea por bactérias anaeróbias no fundo da lagoa (parte de DBO em suspensão e sedimentada) (VON SPERLING, 2014).

Já as lagoas de maturação são unidades para pós-tratamento, com pequenas profundidades, geralmente, podendo atingir altas eficiências na remoção de microrganismos. Devido à exposição prolongada à radiação solar (raios UV), pH alcalino e altos valores de oxigênio dissolvido, geralmente há a remoção ou inativação

de bactérias e vírus, enquanto ovos de helmintos e cistos de protozoários tendem a sedimentar. O objetivo principal dessa lagoa é remover os organismos patogênicos, sendo uma opção mais econômica à desinfecção por métodos mais convencionais, como a cloração (VON SPERLING, 2014; VON SPERLING, 2002).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

Neste estudo, foram investigados os afluentes de três estações de tratamento de esgoto (ETEs) localizadas na região de Belo Horizonte/MG, identificadas como ETE 1, ETE 2 e ETE 3, quanto à concentração de BHTs, BRAs e GRAs, e efluente da ETE 3.

A ETE 1 opera com capacidade para cerca de 1,6 milhões de habitantes e vazão de 3,375 m<sup>3</sup>/s, atendendo cerca de 1,45 milhões de habitantes atualmente. Além disso, recebe efluente predominantemente de origem doméstica, oriundo de população com poder aquisitivo médio/alto, de uma parte dos municípios de Belo Horizonte (79%), Contagem (14%) e Sabará (7%). Também recebe contribuições de efluentes líquidos industriais de diversas modalidades, que são previamente tratados antes de serem lançados na rede pública de esgotos, atendendo padrões estabelecidos na norma técnica 187/5 (COPASA, 2017).

Por sua vez, a ETE 2 atende uma população de cerca de 1,2 milhões de habitantes, com vazão máxima na ordem de 1,8 m<sup>3</sup>/s, tendo uma capacidade máxima para 2,4 m<sup>3</sup>/s (CHERNICHARO, 2016). Trata-se de efluentes predominantemente domésticos, gerados em uma parte de Belo Horizonte (73,4%) e Contagem (26,4%), oriundos de população de poder aquisitivo baixo/médio (SILVA, 2009). Além disso, tem contribuições de esgotos industriais de diversas modalidades, lodo de tanque séptico e lixiviado de aterro sanitário (GONÇALVES *et al.*, 2015; SILVA, 2009).

Por fim, a ETE 3 recebe esgoto do aeroporto internacional, com contribuições do terminal de passageiros, terminal de cargas, dependências administrativas (instalações sanitárias e cozinhas). Existem contribuições pontuais com possíveis características industriais, referentes às cloacas (sanitários das aeronaves), hangar de manutenção de uma das companhias aéreas e oriundos de atividades de manutenção/pintura/reparo de aeronaves (PASSOS, 2012).

Na ETE 3, além do afluente, também será investigado o efluente do sistema permitindo que seja determinada a eficiência desta ETE na remoção de BHTs, BRAs e GRAs.

- Descrição do sistema de tratamento

A ETE 3 possui área aproximada de 3,6 hectares e seu sistema é composto por lagoas de estabilização. A Figura 4 ilustra o fluxograma do sistema de tratamento a ser analisado.



Fonte: AUTORA (2022).

Como mostra o esquema, o tipo de tratamento envolve a etapa de tratamento preliminar, composta pela grade manual para a fase sólida. Este sistema não contém desarenador. Posteriormente, tem-se o medidor de vazão (calha *Parshall*), seguido pela lagoa facultativa e a lagoa de maturação.

Através da Tabela 4 visualiza-se as principais características das lagoas.

**Tabela 4 – Principais características do sistema de tratamento de esgotos da ETE 3**

|                          | Lagoa Facultativa | Lagoa de Maturação |
|--------------------------|-------------------|--------------------|
| Formato                  | Trapezoidal       | Trapezoidal        |
| Espelho d'água (ha)      | 1,99              | 0,47               |
| Volume máximo (m³)       | 55.000            | 5.105              |
| Profundidade operada (m) | 2,9               | 0,47               |

Fonte: PASSOS (2012).

As amostras foram coletadas em dois pontos específicos: afluente à lagoa facultativa e efluente à lagoa de maturação, ou seja, o esgoto bruto e o esgoto tratado.

## 4.2 Coleta de amostras

As coletas das amostras líquidas nas estações de tratamento de esgotos foram semanais, durante o período de outubro/2021 a junho/2022, resultando em 29 amostras para cada ponto especificado, tanto do esgoto bruto das ETEs 1, 2 e 3, quanto do efluente tratado da ETE 3.

Foram armazenadas em recipientes identificados de polipropileno estéreis e encaminhadas, sob condições de refrigeração em caixas de isopor com gelo, das estações para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA – UFMG).

Ressalta-se que o presente trabalho coletou amostras de esgoto com o intuito de se analisar a concentração de BRAs e GRAs no período de outubro de 2021 a junho de 2022, referente à terceira onda da pandemia no Brasil, e em Minas Gerais.

#### **4.3 Análises microbiológicas de BHTs e BRAs cultiváveis: quantificação e isolamento**

Para as análises microbiológicas e moleculares de BRAs cultiváveis das amostras, foi realizada a quantificação e o isolamento destas. Realizou-se a enumeração de BHTs e BRAs cultiváveis no meio de cultivo *Plate Count Agar* (PCA, Kasvi) sem e com a adição de antibióticos. Houve a diluição das amostras em série e a inoculação de específicas quantidades e diluições (variando de 20 µL, a 50 µL e 100 µL), por *spread plate*, seguindo o método de plaqueamento padronizado por *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2002).

Seguiu-se a mesma metodologia para a avaliação do crescimento de BRAs, adicionando ao meio PCA os antibióticos em concentrações específicas:

- Amoxicilina (32,0 mg/L – classe  $\beta$ -lactâmicos);
- Azitromicina (32,0 mg/L – classe macrolídeos);
- Cefalexina (16,0 mg/L – classe  $\beta$ -lactâmicos);
- Meropenem (32,0 mg/L – classe  $\beta$ -lactâmicos);
- Sulfametoxazol e trimetoprim (350,0 mg/L, cada um – classe sulfonamidas).

Tais antibióticos são comumente utilizados não somente no Brasil, mas também no restante dos países do mundo, devido a isso foram escolhidos. Além disso, as concentrações utilizadas foram determinadas de acordo com metodologias e trabalhos prévios (MACHADO, 2019; MACHADO *et al.*, 2022).

As placas de *Petri* foram incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Logo, as Unidades Formadoras de Colônias foram contadas com 48 horas em temperatura ambiente e,

após 5 dias, foram recontadas. Após essa enumeração, selecionou-se até 3 colônias, de cada meio de cultivo (placa) com antibióticos, com características morfológicas diferentes, como coloração, tipo de borda e elevação. As colônias foram colocadas em microtubos com água ultrapura e glicerol.

Posteriormente, novas placas *petri* foram preparadas para o plaqueamento das colônias isoladas, utilizando-se o meio de cultura *Mueller Hinton Agar* (MH). Cerca de 20 µL de cada colônia previamente isolada, armazenada em água ultrapura e glicerol, foi colocado em microtubos com 1000 µL de caldo BHI. Esses microtubos com as colônias e caldo ficam armazenados a 35°C, com agitação, por 24 horas. Logo, cada colônia individual foi inoculada nas placas pela técnica de esgotamento por estrias, sendo armazenadas em estufa por 24 horas a 37°C. Por fim, para se identificar estes microrganismos isolados, utilizou-se a técnica MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*), conhecida por espectrometria de massas, disponível na Escola de Veterinária da UFMG.

#### **4.4 Pesquisa por cepas multirresistentes (MDR) entre as BRAs isoladas e identificadas: investigação de suscetibilidade e resistência aos antibióticos**

Através do método de antibiograma em placa, ou método de disco-difusão em ágar modificado por Kirby-Bauer, foi possível investigar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos, seguindo as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

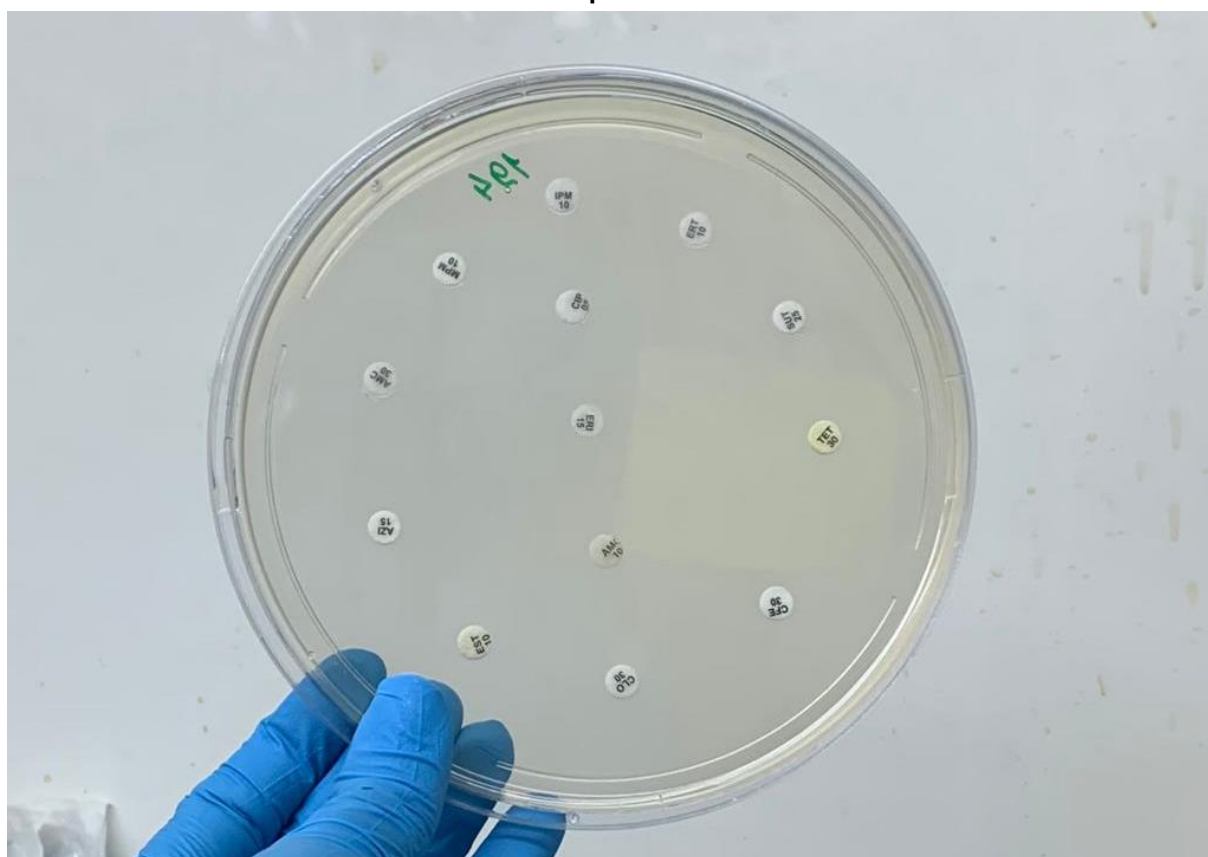
Foram selecionadas para a pesquisa de multirresistência (MDR) 43 cepas das que foram isoladas e, posteriormente, identificadas através do método mencionado no item anterior. As colônias escolhidas foram inoculadas em placas *petri* com meio de cultivo PCA e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a preparação do inóculo, uma alçada de cada uma das colônias que cresceram nos meios foi transferida para um tubo com solução salina (0,9%). A suspensão da solução salina em conjunto com a colônia foi comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de *Mc Farland*, sendo equivalente a uma suspensão contendo  $1 \times 10^8$  e  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

A suspensão foi homogeneizada e, posteriormente, foi feita a inoculação em novas placas *petri* contendo o meio de cultura *Mueller-Hinton Agar* (Oxoid, Inglaterra). Essa

inoculação nos meios de cultura foi realizada com o auxílio de *swab* estéril, que foi previamente umedecido com a solução bacteriana e o excesso retirado por meio da compressão do mesmo contra as paredes do tubo que continha a solução. Inoculou-se a solução em toda a superfície do meio de cultura, girando-se a placa e o *swab*.

Após alguns minutos de semeadura, colocou-se os discos comerciais que continham os antibióticos na superfície do meio de cultura, utilizando-se uma pinça. Foram utilizados 13 discos de antibióticos diferentes para a análise (Figura 5), sendo eles: azitromicina (15 µg - AZT), amoxicilina (10 µg - AMO), amoxicilina + ac. clavulânico (30 µg - AMC), ciprofloxacina (5 µg - CIP), cloranfenicol (30 µg - CLO), cefalexina (30 µg - CFE), eritromicina (15 µg - ERI), estreptomicina (10 µg - EST), tetraciclina (30 µg - TET), sulfametoxazol + trimetoprim (25 µg - SUT), imipenem (10 µg - IPM), meropenem (10 µg - MPM) e ertapenem (10 µg - ERT).

**Figura 5 – Placa *petri* com meio de cultura, bactéria inoculada e discos de antibióticos dispostos**

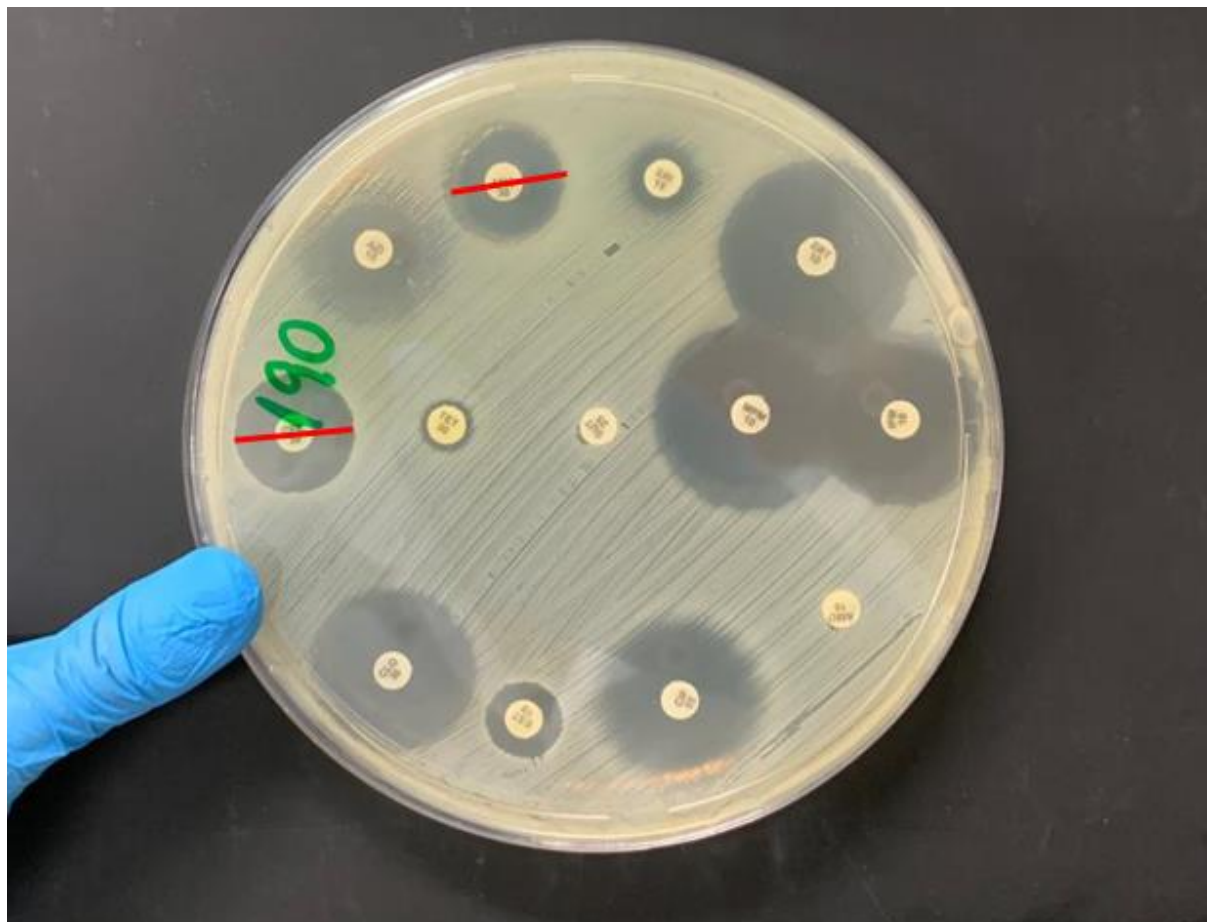


Fonte: AUTORA (2023).

As placas foram incubadas a 37°C por 16 a 18 horas. Logo, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição (centímetros), provocados pelos discos de

antibióticos, de cada uma das amostras bacterianas (Figura 6). As cepas foram classificadas em sensíveis ou resistentes de acordo com o diâmetro medido referente ao halo de inibição, sendo estes comparados com tabelas padronizadas.

**Figura 6 – Antibiograma, método de difusão em ágar**



Fonte: AUTORA (2023).

Logo, conforme comentado, os diâmetros dos halos formados são medidos, enquanto os halos transparentes mostram a ausência de crescimento ou sensibilidade da bactéria. Com a análise dos resultados do antibiograma, seguiu-se o método estipulado de diagnósticos microbiológicos especializados (DME) BRCast (2022) para a interpretação dos dados e para definir se a colônia é multirresistente ou não.

#### **4.5 Processamento das amostras para análise de genes de resistência**

Para a quantificação dos GRAs, todas as amostras passaram por uma filtragem em membranas de mistura de ésteres de celulose, com porosidade igual a 0,22  $\mu\text{m}$ , e os volumes filtrados variaram de 30 a 50 mL. As membranas foram armazenadas em microtubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e colocadas a -80 °C.

## 4.6 Análises moleculares

### 4.6.1 Extração de DNA

Seguidamente, as membranas com o material retido foram submetidas à extração de DNA, utilizando-se o kit de extração *FastDNA® SPIN Kit for Soil* (MPBiomedicals®), seguindo-se as instruções do manual do fabricante. Após a extração, o material genético foi quantificado através do espectrofotômetro *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific®). Em seguida, o material foi analisado com técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real.

### 4.6.2 Quantificação de elementos genéticos de resistência a antibióticos

Na técnica de PCR em tempo real, tem-se a quantificação exata e reprodutível segundo a fluorescência emitida, permitida pelo ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, chamado de Ciclo de *Threshold* (Ct). Através dos gráficos gerados, tem-se a visualização das amplificações, cuja intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado na reação (FREITAS, 2020).

A escolha dos genes que foram analisados foi baseada em dados de consumo de antibióticos no Brasil e no mundo (WHO, 2018) e estudos relacionados à quantificação de elementos genéticos de resistência. Esta metodologia foi escolhida para se estimar o número de cópias por mililitro, utilizando-se *primers* específicos, dos genes (FREITAS, 2020; PAZDA *et al.*, 2019):

- RNAr 16S (domínio Bacteria);
- Genes de resistência à Sulfonamidas (*sul1*);
- Genes de resistência à Tetraciclinas (*tetA*);
- Genes de resistência à  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro (*blaTEM*);
- Genes de resistência à Macrolídeos (*ermB*);
- Genes de resistência à Quinolonas (*qnrB*);
- *Integron* classe 1 (*int1*).

#### 4.6.2.1 Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas padrão de qPCR

Para se traçar as curvas padrão dos ensaios de qPCR das amostras, foram utilizados plasmídeos recombinantes contendo os genes de interesse. A ligação do produto da

PCR amplificado foi desenvolvida em vetor plasmidial (*pGEM®-T Easy Vector*), introduzindo em células de *E. coli* JM109, conforme as instruções do fabricante (Promega; Madison, WI). As linhagens clonadas e o material genético foram concebidos durante estudo anterior (FREITAS, 2020).

A extração dos plasmídeos foi feita por intermédio do kit de extração *GenElute™ HP Five-Minute Plasmid Miniprep*, com o auxílio das instruções do fabricante (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), e o DNA foi quantificado no equipamento *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific®). Foram preparadas alíquotas dos plasmídeos e colocadas em preservação a -20 °C, para a elaboração das curvas padrão nos ensaios de qPCR.

Com o intuito de se obter a concentração dos plasmídeos (em nº de cópias/μL) no primeiro ponto das curvas, utilizou-se a Equação 1. Para isso, considerou-se que 1 mol de par de base (pb) possui 649 g (1 mol equivale a  $6,022 \times 10^{23}$  moléculas – ou cópias), e que o tamanho do plasmídeo recombinante (PR) é igual ao tamanho do plasmídeo (3015pb) + inserto (correspondente ao tamanho do *amplicon*, que varia de acordo com o gene de interesse).

$$\text{Nº de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentração do PR } \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\right) \times 6,022 \times 10^{23} (\text{cópias})}{\text{Tamanho do PR em pb} \times 649(\text{g})} \quad (1)$$

Estimou-se a quantidade de DNA do inserto (em nanogramas) e foram feitas diluições do DNA plasmidial para os genes de interesse (RNAr 16S, *int1*, *sul1*, *tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*) em água ultrapura na proporção de 1:10, para calibrar e padronizar as curvas. As reações da qPCR foram feitas em seis pontos e em triplicata, com um volume de 2,0 μL de cada diluição adicionado em cada reação, e as respectivas curvas de amplificação foram utilizadas para a realização da equação linear do experimento. Para se averiguar a eficiência da curva, foi considerado  $r^2 > 0,99$ , com eficiência obtida no intervalo de 90 a 110%.

#### 4.6.2.2 qPCR

Como mencionado, através da técnica de qPCR, tem-se a obtenção da intensidade de fluorescência e pode ser feita a quantificação absoluta dos genes estudados. Essa intensidade é emitida por um fluorófilo que se liga ao DNA e aumenta exponencialmente conforme o gene é amplificado, até que seja atingido um platô pela



reação, que acontece por causa do consumo dos reagentes ou até mesmo acúmulo de inibidores. Para as amostras, controles negativos e diluições da curva padrão, as reações foram feitas em triplicata, perfazendo um volume final de 20 µL em cada reação, sendo 10 µL de mix (*PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix*), 2,0 µL da amostra de DNA a ser investigada e os *primers* individuais de cada gene variando entre 250 a 400 nM. As reações foram completadas com água ultrapura para se atingir o volume final.

O *mix* empregado contém tampão de PCR, MgCl<sub>2</sub>, enzima *Taq polimerase*, dNTPs e corantes ROX™ e SYBR™ *Green*. Neste último, tem-se um composto fluorescente que se liga na fita dupla de DNA e emite a fluorescência conforme vai acontecendo a reação de amplificação. Com a captação dessa fluorescência pelo equipamento, é observada sua medição quando cada ciclo é finalizado. Ao se converter a emissão luminosa em números, encontra-se a quantidade de DNA amplificado (absoluta ou relativa).

A quantificação dos elementos genéticos investigados foi realizada por meio do equipamento *BioRad CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System* em conjunto com o *CFX Manager software*, com condições de reação adotadas de acordo com estudos prévios, que podem ser visualizadas na Tabela 5. O encerramento do programa se dá com a elaboração da curva de *melting* (ou de dissociação), ideal para a checagem de pureza nos produtos amplificados.

Essa etapa é importante para se verificar a possível ocorrência de amplificação de produtos inespecíficos (como, por exemplo, dímeros de *primer*), que podem super ou subestimar os dados. Tal etapa consistiu em 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C para todas as reações.

Tabela 5 – Condições adotadas para os ensaios de qPCR

| Gene            | Primers e sequências                                                         | Amplicon (pb) | Condições                                                                                | Concentrações de primers na reação | Referência                              |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>RNAr 16S</b> | 1055-F<br>ATGGCTGTCGTCAGCT<br>1392-R<br>ACGGGCGGTGTGTAC                      | 337           | 95°C por 10 min (1 ciclo);<br>95°C por 15 s, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min (30 ciclos) | 375 nM                             | FERRIS <i>et al.</i> , 1996             |
| <b>int1</b>     | int1-F<br>CCTCCCGCACGATGATC<br>int1-R<br>TCCACGCATCGTCAGGC                   | 280           | 95°C por 10 min (1 ciclo);<br>95°C por 15 s, 55°C por 30 s e 72°C por 10 s (40 ciclos)   | 400 nM                             | GOLDSTEIN <i>et al.</i> , 2001          |
| <b>sul1</b>     | sul1-F<br>CGCACCGGAAACATCGC<br>TGCAC<br>sul1-R<br>TGAAGTTCCGCCGAAG<br>GCTCG  | 163           | 95°C por 5 min (1 ciclo);<br>95°C 15 s, 60°C por 1 min (40 ciclos)                       | 400 nM                             | MAO <i>et al.</i> , 2015                |
| <b>tetA</b>     | tetA-F<br>GCTACATCCTGCTTGCCT<br>TC<br>tetA-R<br>CATAGATCGCCGTGAAGA<br>GG     | 210           | 94°C por 5 min (1 ciclo);<br>94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 30 s (40 ciclos)   | 300 nM                             | MAO <i>et al.</i> , 2015<br>SOUZA, 2017 |
| <b>blaTEM</b>   | blaTEM-F<br>GCACGAGTGGGTTACAT<br>CGA<br>blaTEM-R<br>GGTCCTCCGATCGTTGTC<br>AG | 311           | 95°C por 5 min (1 ciclo);<br>95°C 1 min, 48°C por 30 s e 72°C por 30 s (40 ciclos)       | 400 nM                             | CARLSON <i>et al.</i> , 1999            |
| <b>ermB</b>     | ermB-F<br>CGTGCGTCTGACATCTAT<br>CTGA<br>ermB-R<br>CTGTGGTATGGCGGGTA<br>AGTT  | 190           | 95°C por 10 min (1 ciclo);<br>95°C por 10 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s (40 ciclos)   | 300 nM                             | MAO <i>et al.</i> , 2015                |
| <b>qnrB</b>     | qnrB-F<br>GCGACGTTTCAGTGGTTCA<br>G<br>qnrB-R<br>TGTCCAACCTTAACGCCTT<br>GTAA  | 148           | 95°C por 10 min (1 ciclo);<br>95°C por 10 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s (40 ciclos)   | 300 nM                             | MAO <i>et al.</i> , 2015                |

Fonte: indicadas na tabela.

Através dos valores de Ct (ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial), foi estimado o número de cópias/ $\mu$ L de cada reação, com o auxílio da curva padrão correspondente, e da Equação 2. O valor de Ct para determinada concentração é representado por  $Y$ , sendo utilizado para calcular o número inicial de cópias de DNA; enquanto a inclinação da reta da curva padrão (*slope*) é representada por  $a$ ; o Ct na origem é representado por  $b$  (*Y-intercept*); e o logaritmo de cada concentração conhecida na série de diluição é representado por  $x$ . Outros parâmetros são observados e obtidos por meio da curva padrão, como o desempenho da reação (eficiência) e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Dentro dos valores limites da curva padrão, deve ser abrangida a faixa de concentrações que se esperam encontrar nas amostras.

$$Y = aX + b \quad (2)$$

Onde:

Y = valor de Ct;

a = inclinação da reta (*slope*);

X = nº de cópias em escala logarítmica;

b = ordenada na origem (*Y-intercept*).

Os valores de Ct são passados para dados quantitativos, que correspondem ao número de cópias do gene investigado. A inclinação da reta está relacionada com a eficiência da reação de qPCR, enquanto os dados são calibrados a partir da ordenada da origem, que deve estar situada em um intervalo de 90 a 100% (inclinação de -3,58 a -3,10), preferencialmente. Para de analisar o quão bem os dados são ajustados na curva padrão e a linearidade da curva, tem-se o coeficiente de correlação ( $r^2$ ). Geralmente, para as análises de qPCR, os valores de  $r^2$  devem ser superiores a 0,99.

Como citado anteriormente, após serem convertidos, os resultados são expressos em número de cópias/mL, levando em conta os volumes que foram filtrados de cada amostra na etapa de processamento, além das diluições que foram feitas para a amplificação.

#### 4.7 Análise de dados

A eficiência de remoção, tanto para BRAs quanto para os genes investigados, em cada ponto de amostragem na ETE 3, foi calculada conforme mostra a Equação 3:

$$\text{Valores de remoção em log (VRL)} = \log \frac{\text{UFC/mL EB}}{\text{UFC/mL ET}} \text{ ou } \log \frac{\text{nº cópias/mL EB}}{\text{nº cópias/mL ET}} \quad (3)$$

A eficiência de remoção (Equação 4), por sua vez, foi estimada para cada grupo de bactérias resistentes e cada um dos genes estudados, considerando a razão entre a concentração (UFC/mL ou nº de cópias/mL) observada no esgoto bruto (EB) e no efluente tratado (ET):

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = \left( \frac{C_e - C_s}{C_e} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

Ce = refere-se à concentração no efluente;

Cs = refere-se à concentração no esgoto bruto.

A prevalência de resistência a antibióticos (Equação 5) foi estimada para cada antibiótico no esgoto bruto e efluente tratado para cada amostra:

$$\text{Prevalência de resistência (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right) \text{ meio com antibiótico}}{\left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right) \text{ meio sem antibiótico}} \times 100 \quad (5)$$

Finalmente, também foi calculada a concentração relativa para cada gene de resistência, conforme Equação 6, correlacionando-se as concentrações absolutas de cada um dos genes (*int1*, *sul1*, *tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*) com as concentrações absolutas dos genes do domínio Bacteria (16S RNAr):

$$\text{Abundância relativa de GRAs} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de cópias/mL de GRAs}}{\text{n}^{\circ} \text{ de cópias/mL de RNAr 16S}} \quad (6)$$

#### 4.8 Análises estatísticas

Para a comparação mais eficaz e tratamento dos dados, inclusive para averiguar os objetivos específicos que requerem tal avaliação, foi feita a análise estatística dos valores encontrados neste trabalho, especialmente para se verificar a eficiência de remoção de BHTs, BRAs e elementos genéticos na ETE 3, além de ser feita a análise para averiguar a existência de diferença significativa entre as três ETEs

Foram utilizadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, valores mínimos e máximos). A fim de se investigar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de BHTs, BRAs e GRAs, para os três pontos afluentes, foi empregado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunn*, quando aplicável.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ocorrência e prevalência de bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes aos antibióticos nas ETEs estudadas

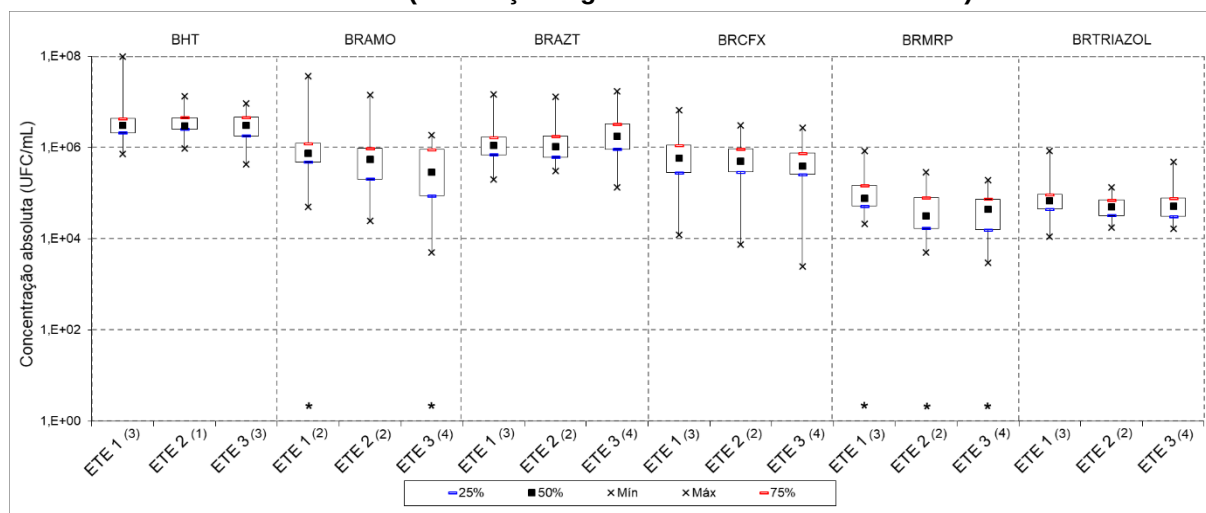
#### 5.1.1 Concentrações absolutas de BHTs e BRAs e prevalência de resistência aos antibióticos investigados no esgoto bruto das três ETEs de estudo

Na Tabela A1 (APÊNDICE A) é possível encontrar todos os resultados que foram obtidos nos experimentos realizados, durante o período amostral (outubro/2021 a junho/2022), relativos à quantificação de BHTs e BRAs, nas amostras de esgoto bruto das ETEs 1, 2 e 3, e esgoto tratado da ETE 3. Os resultados estão em UFCs/mL.

As concentrações absolutas de BHTs e BRAs (UFC/mL) encontrados neste estudo, para o esgoto bruto nos três pontos de amostragem, podem ser melhor visualizados na Figura 7, trazidas pelo gráfico *box-plot*, no qual é possível notar os valores mínimos, máximos e o primeiro, segundo e terceiro quartis, que correspondem aos percentis 25, 50 (mediana) e 75.

As concentrações absolutas medianas afluentes de BHTs nas ETEs 1, 2 e 3 foram cerca de  $3,04 \times 10^6$ ,  $3,01 \times 10^6$  e  $3,10 \times 10^6$  UFCs/mL, respectivamente, estando na mesma ordem de grandeza. É possível observar que os valores foram bem próximos, assim como o comportamento dos dados também foram similares. Nestas amostras, especificamente, não se observou uma alta variabilidade dos dados.

**Figura 7 – Concentrações absolutas de BHTs e BRAs nas amostras de EB das ETEs 1, 2 e 3, em UFC/mL (diferenças significativas assinaladas com \*)**



(1) n = 25; (2) n = 26; (3) n = 27; (4) n = 28.

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL).

Bactérias resistentes à azitromicina (BRAZT) apresentaram maiores concentrações medianas nas três ETEs ( $1,1 \times 10^6$ ,  $1,04 \times 10^6$  e  $1,77 \times 10^6$  UFCs/mL, respectivamente). As bactérias resistentes a meropenem apresentaram menores valores de concentração medianos nas ETEs 2 e 3 ( $3,15 \times 10^4$  e  $4,49 \times 10^4$  UFCs/mL), quando comparadas com o restante das BRAs, seguidos pelas bactérias resistentes a trimetoprim+sulfametoxazol ( $4,93 \times 10^4$  e  $5,12 \times 10^4$  UFCs/mL). Já para a ETE 1, as bactérias resistentes a trimetoprim+sulfametoxazol obtiveram as menores concentrações medianas para a ETE 1 ( $6,75 \times 10^4$  UFCs/mL), seguida pelas bactérias resistentes a meropenem ( $7,75 \times 10^4$  UFCs/mL).

Embora as ETEs 1 e 2 tratem de esgotos com características predominantemente domésticas, em sua maior parte, enquanto a ETE 3 trata de esgoto de um aeroporto internacional, observou-se que as diferenças significativas se deram entre bactérias resistentes à amoxicilina e meropenem, entre as ETEs 1 e 3 e entre os três pontos, respectivamente, para um nível de significância igual a 5% ( $\alpha = 0,05$ ). A estatística descritiva pode ser encontrada na Tabela B1 (APÊNDICE B), enquanto os resultados do teste de *Kruskal-Wallis* e *Dunn*, quando aplicável, é observado na Tabela B2 (APÊNDICE B).

Atentando-se para as diferenças significativas encontradas, para as bactérias resistentes à amoxicilina e meropenem (entre as ETEs 1 e 3), pode-se inferir que as características do esgoto bruto influenciam na concentração circulante dessas bactérias nos esgotos, e consequentemente representa a população contribuinte e seus hábitos (talvez maior consumo desses antibióticos) nos pontos cuja diferença significativa se mostrou evidente. Como comentado, o esgoto bruto nas ETEs 1 e 3 possuem populações contribuintes distintas, com poder aquisitivo distintos, assim como os fatores específicos das regiões, visto que a primeira se refere à região de Belo Horizonte e a segunda a um aeroporto internacional.

Com isso, é possível concluir que as ETEs com regiões geográficas distintas apresentam padrões diferentes de resistência, devido ao padrão distinto no consumo de antibióticos pelas populações. Hendriksen *et al.* (2019), reportaram que a seleção local entre as bactérias e genes de resistência desempenha papel crucial na disseminação da RAM. Isso destaca a importância de abordagens e medidas

adaptadas a nível local para o controle da RAM, levando em consideração, também, os fatores específicos de cada região.

Analisando-se os percentis escolhidos para representar melhor os resultados, a maior dispersão entre os dados pode ser observada para as ETEs 2 e 3, relativo às bactérias resistentes à amoxicilina e meropenem. Em contrapartida, ao se analisar o comportamento para as mesmas bactérias na ETE 1, não é constatada tanta dispersão.

Na Tabela B3 (APÊNDICE B) são encontradas as informações sobre a estatística descritiva feita para as concentrações relativas de bactérias resistentes aos antibióticos de estudo, ou seja, a prevalência de resistência a cada um destes antibióticos, para os pontos afluentes às três ETEs e efluente à ETE 3. Os valores medianos de prevalência de resistência (BRAs/BHTs) aos antibióticos estudados, em porcentagem, tanto nos afluentes das três ETEs quanto no efluente da ETE 3, são mostradas resumidamente na Tabela 6.

**Tabela 6 - Prevalência de resistência (BRAs/BHTs - %) aos antibióticos estudados no EB das ETEs 1, 2 e 3 e ET da ETE 3**

| % Prevalência de Resistência (BRAs/BHTs) | ETE 1        | ETE 2        | ETE 3         |        |
|------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------|
|                                          | EB           | EB           | EB            | ET     |
| <b>Amoxicilina</b>                       | 26,23        | 20,54        | 11,64         | 15,68  |
| <b>Azitromicina</b>                      | <b>28,99</b> | <b>35,61</b> | <b>58,74*</b> | 23,45  |
| <b>Cefalexina</b>                        | 17,11        | 14,22        | 17,09         | 27,21  |
| <b>Meropenem</b>                         | <b>2,96</b>  | <b>0,92</b>  | <b>1,53</b>   | 7,31   |
| <b>Trimetoprim+sulfametoxazol</b>        | 1,91         | 1,46         | 1,59          | 0,66** |

\* Maior prevalência de resistência; \*\* Menor prevalência de resistência; amostras com diferenças significativas estão em negrito; em itálico, mostra o aumento da prevalência de resistência no ET.

Para as concentrações relativas, também foram feitos os testes não paramétricos (*Kruskal-Wallis*, seguido de teste de *Dunn*, quando aplicável), com o intuito de se verificar a existência de diferenças significativas entre a prevalência de resistência entre os afluentes analisados das três ETEs. Os resultados se encontram na Tabela B4 (APÊNDICE B). Como é possível notar, os maiores valores medianos de prevalência de resistência (%) são alusivos à azitromicina, sendo 58,74% para o esgoto bruto da ETE 3. Nas duas outras ETEs (1 e 2), também se observam valores altos para esse antibiótico. Na ETE 1 e 2, o segundo maior antibiótico com prevalência de resistência é a amoxicilina (26,23%). Já para a ETE 3, o antibiótico cuja prevalência de resistência foi a segunda maior, está associado à cefalexina, tanto no esgoto bruto

quanto no efluente tratado. As diferenças de prevalência dos antibióticos encontradas, podem estar associadas às diferentes populações contribuintes de cada ETE, uma vez que a ETE 3 trata esgoto de pessoas de todo o Brasil circulando no aeroporto, com hábitos distintos e poder aquisitivo, e não representa uma população situada numa bacia específica de esgotamento sanitário (como o caso das ETEs 1 e 2). Com isso, é possível inferir que as ETEs com regiões geográficas distintas apresentam padrões diferentes de resistência, devido ao padrão distinto no consumo de antibióticos pelas populações.

A partir dessas constatações, quando se relaciona as BRAs com as BHTs, pode-se sugerir que houve aumento na prevalência das bactérias resistentes circulando nos esgotos durante o período de análise deste estudo. Além disso, supõe-se que, concomitantemente, pode ter ocorrido o aumento no consumo destes antibióticos (amoxicilina, azitromicina e cefalexina) na região de Belo Horizonte, durante o período da pandemia.

Tais informações não podem ser confirmadas de fato, pois não foram disponibilizados dados de consumo de antibióticos, ou até mesmo de vendas de antibióticos, para a cidade de estudo. Além disso, nesta pesquisa, a quantificação de determinados antibióticos não foi o foco. Mas, observando-se os resultados trazidos por Del Fiol *et al.* (2022), no Brasil, entre os antibióticos mais vendidos estão amoxicilina, azitromicina e cefalexina, que contabilizaram 67% das vendas. O consumo de azitromicina, por exemplo, aumentou cerca de 5,8% por mês, principalmente no período inicial da pandemia da COVID-19. Böger *et al.* (2021) também detectaram antibióticos, em amostras de rios em Curitiba, sendo os dois maiores reportados a amoxicilina seguido por azitromicina.

A prevalência de resistência (%) foi maior no efluente tratado para os antibióticos amoxicilina, cefalexina e meropenem, ao se considerar os valores obtidos no esgoto bruto. Isso indica que, embora a ETE 3 tenha removido cerca de 2 unidades log de BRAs (conforme será mostrado no item seguinte), observou-se que ainda existia grande concentração de BRA no efluente tratado, acarretando o aumento da prevalência de resistência para esses antibióticos mencionados. Isso indica que o

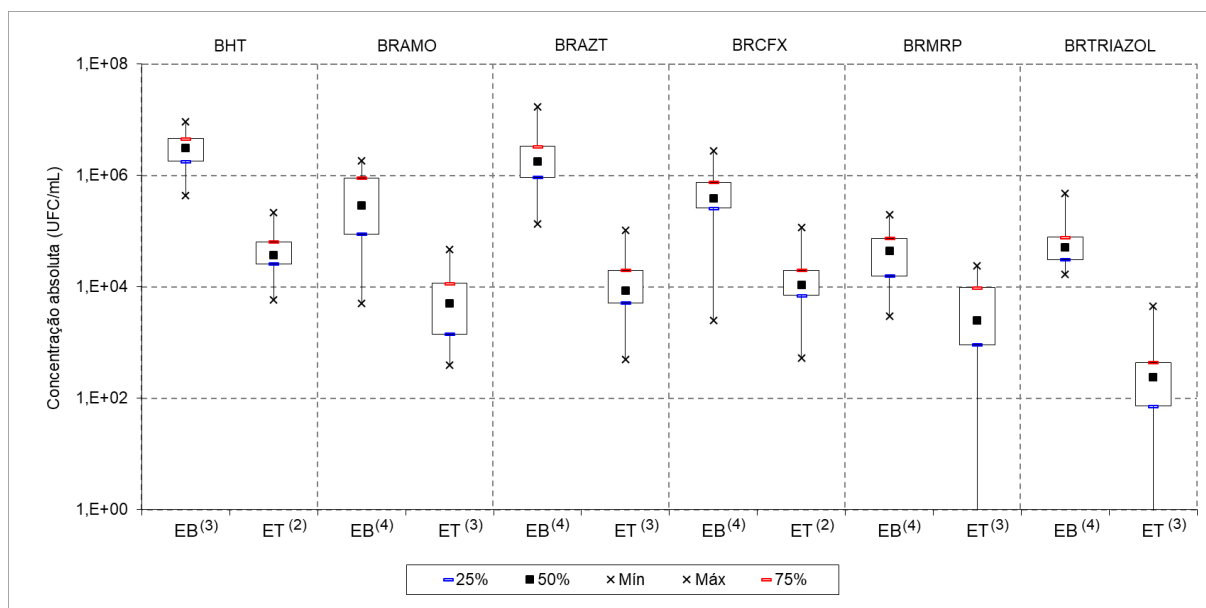


efluente tratado ainda pode disseminar a resistência e impactar o ambiente e o corpo receptor.

### 5.1.2 Investigação da ocorrência e remoção de BHTs e BRAs em sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação (ETE 3)

Com o propósito de se investigar somente as concentrações de BHTs e BRAs na ETE 3, avaliando o sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação, optou-se por separar o gráfico e trazer os dados separadamente. A Figura 8 mostra o gráfico *box-plot* gerado com as concentrações absolutas de BHTs e BRAs encontradas nas amostras afluente e efluente da ETE 3, em UFC/mL, durante todo o período amostral.

**Figura 8 – Concentrações absolutas de BHTs e BRAs nas amostras de EB e ET da ETE 3, em UFC/mL**

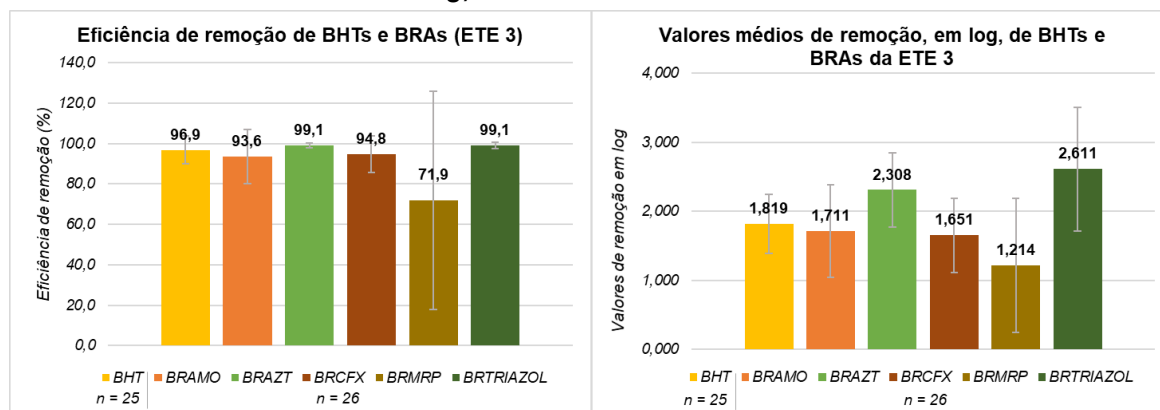


(1) n = 25; (2) n = 26; (3) n = 27; (4) n = 28.

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL).

Como comentado, no esgoto bruto, os menores valores de concentração foram para bactérias resistentes ao meropenem, enquanto os maiores para bactérias resistentes à azitromicina. Com a intenção de se averiguar a remoção desses agentes, foram feitos os cálculos da eficiência de remoção (%) mediana e valores medianos de remoção em log. Estes resultados são expostos na Tabela C1 (APÊNDICE C), para todo o período amostral. Além disso, a Figura 9 expõe de maneira resumida a eficiência de remoção mediana (%) do sistema de tratamento analisado neste estudo e os valores medianos de remoção em escala logarítmica.

**Figura 9 – Eficiência de remoção (%) média e valores médios de remoção, com desvio padrão, em log, de BHTs e BRAs na ETE 3**



As maiores eficiências de remoção encontradas foram para bactérias resistentes à combinação entre sulfametoxazol e trimetoprim (BRTRIAZOL - 99,1%  $\pm$ 1,5%, que corresponde a 2,61 log  $\pm$ 0,89), assim como para bactérias resistentes à azitromicina (99,1%  $\pm$ 1,0%, que corresponde a 2,31 log  $\pm$ 0,54), enquanto a menor eficiência foi para bactérias resistentes à meropenem, sendo cerca de 71,9%  $\pm$ 53,91% (1,21 log  $\pm$ 0,97), cujo desvio padrão também foi maior, indicando maior variabilidade nas concentrações obtidas.

Considerando-se todos os valores de remoção em log (VRL) calculados individualmente e apresentados na Tabela C1 (APÊNDICE C), ao se observar os valores mínimos e máximos, percebe-se a existência de valores variando entre -0,342 (o que indica o aumento da concentração no efluente) até 4,5 log, para todas as BRAs. Analisando-se individualmente cada um, para BHTs os valores de remoção variaram de 0,46 a 2,52 log; BRAMO de 0,18 a 2,77 log; BRAZT de 1,5 a 3,72 log; BRCFX de 0,38 a 2,45 log; BRMRP de -0,34 a 4,45 log; e BRTRIAZOL de 1,19 a 4,5 log. Ou seja, o sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação chegou a remover mais de 4 log de bactéria resistentes ao conjunto de antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim e meropenem. Em contrapartida, também para bactérias resistentes a meropenem, cuja variabilidade nos valores de concentração foi a maior ao se comparar com o restante, o sistema indicou um aumento na concentração para o efluente tratado, acusando valores de remoção negativos.

Asfaw *et al.* (2017), analisando o comportamento de lagoas facultativas seguido por seis unidades de lagoas de maturação, reportou remoção de aproximadamente 2,1 de BHTs, sendo próximo (ligeiramente superior) que o valor encontrado neste estudo

(1,9 log). Todavia, o sistema analisado neste estudo é composto somente por uma lagoa de maturação, o que influencia no resultado e na comparação entre eles, visto que a maior quantidade de lagoas de maturação impacta na qualidade do efluente tratado, conseqüentemente na maior remoção de sólidos suspensos, por exemplo. Não obstante, McConnell *et al.* (2018) encontrou valor de remoção de *E. coli* e do indicador de contaminação fecal (*Bacteroides*) de 2,2 log em estação de tratamento contendo lagoa aerada, portanto valor próximo ao do presente trabalho (apesar de estes não terem avaliado BRAs).

A Tabela 7, mostrada no item 5.1.3, traz os valores de remoção para outros estudos, com diferentes tipos de tratamento e em outros países. Machado *et al.* (2022) estudaram três pontos de esgotos brutos em Belo Horizonte/MG, nos anos de 2017 e 2018. Os tipos de tratamento na primeira ETE estudada (ETE A) foi de lodos ativados convencional (LAC); a segunda ETE analisada (ETE B) é composta por sistema UASB seguido por filtro biológico percolador (FBP); por fim, a terceira ETE analisada (ETE C) é composta por lodos ativados com remoção biológica de nutrientes, seguido de tratamento físico-químico para remoção de fósforo e desinfecção por radiação UV. Os esgotos brutos das ETES A e B são os mesmos estudados nesta pesquisa, em períodos diferentes.

Para BHTs, o primeiro sistema (ETE A) removeu cerca de 0,9 log, enquanto o segundo (ETE B) removeu 0,3 log. O terceiro sistema de tratamento (ETE C) removeu cerca de 2,5 log, até a etapa de desinfecção, havendo um aumento de 0,1 log pós desinfecção por UV. Em relação às bactérias resistentes à amoxicilina (BRAMO), observou-se remoções médias de 0,9 e 0,2 log, para as ETES A e B. Para a ETE C, notou-se uma remoção na concentração média de 2,8 log, havendo um aumento de 0,4 log após a etapa de desinfecção por UV. Por fim, para bactérias resistentes à combinação dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim (BRTRIAZOL), nas ETES A e B, a remoção foi de 1,3 e 0,3 log. Já na ETE C a remoção dessas bactérias foi de 2,3 log, não sendo reportada remoção após a desinfecção por UV (MACHADO *et al.*, 2022).

O sistema de lagoa facultativa, seguido por lagoa de maturação, foi capaz de remover uma maior concentração de BHTs, BRAMO e BRTRIAZOL, quando comparado com

os valores reportados por Machado *et al.* (2022), comparando com as ETEs A e B. Neste estudo, estes valores médios foram iguais a 1,9, 1,7 e 2,5 log. O sistema da ETE C é composto por reator de lodo ativado, seguido de decantador lamelar para remoção de nutrientes, e uma etapa final de desinfecção UV. Ao se comparar com os valores de remoção médios reportados na ETE C com as lagoas, verificou-se que as concentrações médias removidas pelas lagoas foram ligeiramente menores, obtendo-se uma diferença de 0,6 e 1,1 log (BHTs e BRAMO). Todavia, a remoção de BRTRIAZOL foi semelhante, tendo-se uma diferença pequena de 0,2 log a mais para o sistema de lagoas. A remoção por desinfecção UV, no entanto, não foi eficaz e, na mesma pesquisa, foi mostrado que ocorreu a pressão seletiva de certas comunidades de BRAs, havendo a seleção e aumento da prevalência destas.

Dias *et al.* (2022) investigaram um sistema de lodos ativados com remoção de nutrientes, seguido por desinfecção UV, na cidade de Ibirité/MG, no ano de 2019. Para BHTs, os autores reportaram remoção média de 2,7 log, seguindo de uma remoção de 0,4 log após a desinfecção por UV. Este sistema também foi capaz de remover em média 2,6 log de bactérias resistentes à amoxicilina (BRAMO), havendo aumento de 0,3 log após a desinfecção por UV. Em média, cerca de 1,0 log de bactérias resistentes à cefalexina (BRCFX) foram removidas, havendo uma remoção média baixa de 0,2 log após a desinfecção. Novamente, ao se comparar com o presente estudo, apenas para BRCFX foram reportados valores médios de remoção maiores que do estudo de Dias *et al.* (2022). A lagoa facultativa, seguida de lagoa de maturação, removeu em média 1,8 log de BRCFX, sendo 0,8 log maior. Em relação às outras bactérias estudadas (BHTs e BRAMO), as lagoas removeram uma menor concentração média, sendo 0,8 e 0,9 log menores, respectivamente. No trabalho destes autores, também foi observado um aumento na concentração de BRAMO após a desinfecção por UV, mostrando, novamente, uma seleção/pressão seletiva destas bactérias específicas. Contudo, os autores realizaram somente três coletas, resultando em um *n amostral* menor e em intervalo de tempo menor, levando a resultados menos precisos de análise estatística. McConnell *et al.* (2018), investigando também ETE com sistema de lodos ativados modificado para remoção biológica de nutrientes seguido de desinfecção por UV, no Canadá, verificou remoção de 2.6 log cópias/mL para o indicador de contaminação fecal humana (*Bacteroides*).

Portanto, valores próximos e mais altos do que as remoções verificadas de BRAs do presente trabalho.

Para BHTs, na Polônia, Makowska *et al.* (2016) estudaram uma estação de tratamento de esgoto composta por lodos ativados, reportando valores de remoção (mínimo e máximo) de 2,05 e 2,38 log. LE *et al.* (2018), por sua vez, encontraram valores de remoção médios de BHTs de 1,0 a 6,8 log, para sistemas ativados convencional, na China.

Em Portugal, NOVO&MANAIA (2010) estudaram uma estação caracterizada por lodos ativados convencional, seguido de filtro biológico percolador e filtro aerado submerso, encontrando valor de remoção médio de 1,3 log. Para BRAMO, os autores relataram também uma remoção média de 1,3 log.

Por fim, Glady-Croue *et al.* (2018) reportaram valores médios de remoção igual a 2,94 log, para um sistema de radiação solar artificial em escala piloto, enquanto para BRAMO a remoção média foi de 2,8 log.

Na presente pesquisa, os valores de remoção de BHTs variaram de 0,46 a 2,5 log (mínimo e máximo), e 0,2 a 2,8 log (mínimo e máximo, podendo ser visualizados na Tabela C1 de APÊNDICE C), cuja média se mostrou maior somente ao se correlacionar com NOVO&MANAIA (2010), para ambos. Em relação aos outros autores comentados, a remoção do sistema de lagoas apresentou-se menor. Ainda assim, são observados valores adequados de remoção, quando se compara com outros tipos de tratamento.

As diferenças entre os resultados obtidos neste estudo, comparadas com outros sistemas, podem estar relacionadas às características operacionais destes, como parâmetros técnicos (tempo de detenção hidráulica - TDH, remoção de sólidos, entre outros), que não foram relatados e investigados neste estudo. Todavia, propõe-se a hipótese de que o maior tempo de detenção hidráulico nas lagoas pode ter contribuído para a remoção mais efetiva dos sólidos suspensos no efluente tratado, propiciando maior remoção de BRAs e BHTs, além da maior exposição do esgoto à luz solar, em ambas as lagoas, especialmente a lagoa de maturação que possui profundidade menor e, conseqüentemente, tem-se maior exposição à radiação solar e maiores

valores de oxigênio dissolvido. Mas, é imprescindível lembrar que fatores como as condições de operação, manutenção, gerenciamento do lodo, que influenciam no desempenho das ETEs, são de extrema importância para remoção mais eficaz de agentes de resistência a antibióticos. De qualquer forma, enfatiza-se a importância do tratamento biológico de esgoto para aumento da proteção ambiental e da saúde pública.

Em alguns países em desenvolvimento, a abundância de resistência à antibióticos no tratamento de esgoto é relatada como maior do que em países desenvolvidos e, devido a isso, o lançamento de BRAs do efluente tratado teria impacto, visto que as concentrações ainda são altas, mesmo após a remoção. Por isso, nos países em desenvolvimento, a desinfecção do efluente secundário se mostra como uma medida importante para a diminuição da concentração de BRAs no efluente tratado final, sendo a cloração uma opção viável, que pode remover até 3,0 log (HONDA *et al.*, 2020; NOVO&MANAIA, 2010).

#### 5.1.3 Concentrações de BHTs e BRAs reportadas na literatura e no presente estudo

As características geográficas podem influenciar na diversidade microbiana em esgotos brutos, como carga populacional, demografia, clima ou situação epidemiológica, mas ainda se observa certas incertezas acerca da influência desses fatores no microbioma das águas residuais pelo mundo (VOOLAID *et al.*, 2017). Como mencionado, alguns autores também afirmam que as diferenças estruturais das ETEs, tipologias de tratamento, além de condições de operação e manutenção, influenciam na disseminação desses agentes (PAZDA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021) e, conseqüentemente, nas concentrações observadas nas pesquisas. Todavia, ainda se conhece pouco sobre o perfil de bactérias resistentes e elementos de resistência à antibióticos presentes em efluentes em diversos países, especialmente no Brasil.

Hendriksen *et al.* (2019) revelaram clara divisão entre algumas regiões do mundo, em relação à resistência antimicrobiana, com países de alta renda na Europa, América do Norte e Oceania formando um agrupamento distinto, enquanto países de baixa renda na África, Ásia e América do Sul formaram outro agrupamento. Basicamente, mostraram que os países subdesenvolvidos, com saneamento mais precário, são os que mais consomem antibióticos e mais liberam GRAs e BRAs para o meio ambiente,

por meio dos esgotos. Os autores observaram que Vietnã, Índia e Brasil se destacam por apresentarem distribuição mais divergente de genes RAM, podendo ser considerados potenciais "hot spots" para o surgimento de novos mecanismos de resistência antimicrobiana. Outros fatores relacionados à transmissão, como controle de infecção, saneamento, acesso a água limpa, acesso a antimicrobianos de qualidade e diagnósticos garantidos, bem como viagens e migração, também são considerados contribuintes significativos para a RAM.

Na presente pesquisa, foram encontradas concentrações absolutas médias de bactérias heterotróficas totais no esgoto bruto variando de  $10^5$  a  $10^8$  UFCs/mL, ao se analisar os valores mínimos e máximos obtidos através dos experimentos e cálculos. Em relação às bactérias resistentes aos 5 antibióticos e combinações escolhidos para o estudo, foram observados valores mínimos e máximos entre  $10^3$  a  $10^7$  UFCs/mL, também nos pontos afluentes. Esses valores mostram a grande diferença nas concentrações para as diferentes BRAs que circulam nos esgotos sanitários da região de Belo Horizonte/MG.

Para as amostras de efluente tratado, os valores de BHTs reportados nesta pesquisa variaram de  $10^3$  a  $10^5$  UFCs/mL. Para algumas BRAs, não houve detecção (valor igual a 0), enquanto os maiores valores encontrados foram de aproximadamente  $10^5$  UFCs/mL. Aquelas que não foram detectadas, especificamente bactérias resistentes à sulfametoxazol mais trimetoprim, a amostra foi inoculada sem nenhuma diluição, estando presente no esgoto bruto, mas não no efluente tratado. Ou seja, não houve crescimento de nenhuma bactéria resistente à essa combinação de antibióticos no meio de cultivo, para aquela amostra no dia em que foi coletada.

De modo a comparar os resultados do presente trabalho, com dados de estudos prévios, foi feita uma pesquisa na literatura para se observar algumas concentrações médias e valores aproximados de bactérias heterotróficas totais e bactérias resistentes aos antibióticos reportadas na literatura, tanto em esgoto bruto (EB) quanto em efluente tratado (ET), que são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações médias aproximadas de BHTs e BRAs em EB e ET, reportadas na literatura e no presente estudo

| Bactéria | Esgoto Bruto (UFC/mL)                                                                                                                                  | Esgoto Tratado (UFC/mL)                                                                                                                               | Efluente pós desinfecção (UFC/mL)               | Remoção em log    | Tipo de tratamento | País          | Referência                       |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------|----------------------------------|
| BHTs     | 2,1x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                    | 10 <sup>4</sup>                                                                                                                                       | 10 <sup>3</sup>                                 | 0,9               | LAC                | Brasil        | Machado <i>et al.</i> , 2022     |
|          | 2,7x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                    | 10 <sup>5</sup>                                                                                                                                       |                                                 | 0,3               | UASB+FBP           |               |                                  |
|          | 3,7x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                    | 10 <sup>2</sup>                                                                                                                                       |                                                 | 2,5-0,1           | LA-RBN+FQ+UV       |               |                                  |
|          | 1,8x10 <sup>6</sup> – 2,4x10 <sup>7</sup>                                                                                                              | 1,6x10 <sup>4</sup> – 1,0x10 <sup>5</sup>                                                                                                             |                                                 | 2,05 – 2,38       | LA                 | Polônia       | Makowska <i>et al.</i> , 2016    |
|          | 2,9x10 <sup>6</sup>                                                                                                                                    | 1,4x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                   | 1,5x10 <sup>4</sup> ALD                         | 1,3               | LAC/FBP/FAS        | Portugal      | NOVO & MANAIA, 2010              |
|          | 3,2x10 <sup>6</sup>                                                                                                                                    | 2,6x10 <sup>4</sup> - 7,5x10 <sup>4</sup>                                                                                                             |                                                 | 1-5,3 LAC         | LAC/MBR            | China         | LE <i>et al.</i> , 2018          |
|          | 1,1x10 <sup>4</sup> (±2,7x10 <sup>2</sup> )                                                                                                            | 12,5 (±2)                                                                                                                                             |                                                 | 2,94              | RSA                | Austrália     | Glady-Croue <i>et al.</i> , 2018 |
|          | 1,9x10 <sup>8</sup>                                                                                                                                    | 1,6x10 <sup>6</sup>                                                                                                                                   |                                                 | 2,1               | LF+LM              | Etiópia       | Asfaw <i>et al.</i> , 2017       |
|          | Esgoto hospitalar*<br>2x10 <sup>7</sup>                                                                                                                | 4,3x10 <sup>4</sup>                                                                                                                                   |                                                 | 2,7/0,4           | LAC+UV             | Brasil        | Dias <i>et al.</i> , 2022        |
|          | <b>6,9x10<sup>6</sup> (±1,9x10<sup>7</sup>)</b><br><b>3,9x10<sup>6</sup> (±2,5x10<sup>6</sup>)</b><br><b>3,5x10<sup>6</sup> (±2,3x10<sup>6</sup>)</b>  | <b>5,8x10<sup>4</sup> (±5,4x10<sup>4</sup>)</b>                                                                                                       |                                                 |                   | <b>1,9 (±0,4)</b>  | <b>LF+LM</b>  | <b>Brasil</b>                    |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
| BRAMO    | 10 <sup>5</sup>                                                                                                                                        | 10 <sup>3</sup>                                                                                                                                       | 10 <sup>2</sup>                                 | 0,9               | LAC                | Brasil        | Machado <i>et al.</i> , 2022     |
|          | 10 <sup>5</sup>                                                                                                                                        | 10 <sup>4</sup>                                                                                                                                       |                                                 | 0,2               | UASB+FBP           |               |                                  |
|          | 10 <sup>5</sup>                                                                                                                                        | 10 <sup>2</sup>                                                                                                                                       |                                                 | 2,8/-0,4          | LA-RBN+FQ+UAV      |               |                                  |
|          | 6,4x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                    | 3,3x10 <sup>4</sup>                                                                                                                                   |                                                 | 1,3               | LAC/FBP/FAS        | Portugal      | NOVO & MANAIA, 2010              |
|          | 1,6x10 <sup>3</sup>                                                                                                                                    | 2,2                                                                                                                                                   |                                                 | 2,86              | RSA                | Austrália     | Glady-Croue <i>et al.</i> , 2018 |
|          | 4x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                      | 1x10 <sup>3</sup>                                                                                                                                     | 1,8x10 <sup>3</sup>                             | 2,6/-0,3          | LAC+UV             | Brasil        | Dias <i>et al.</i> , 2022        |
|          | <b>2,2x10<sup>6</sup> (±7,0x10<sup>6</sup>)</b><br><b>1,2x10<sup>6</sup> (±2,7 x10<sup>6</sup>)</b><br><b>5,2x10<sup>5</sup> (±5,8x10<sup>5</sup>)</b> | <b>8,8x10<sup>3</sup> (±1,1x10<sup>4</sup>)</b>                                                                                                       |                                                 | <b>1,7 (±0,7)</b> | <b>LF+LM</b>       | <b>Brasil</b> | <b>Presente estudo</b>           |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
|          | BRAZT                                                                                                                                                  | <b>1,7x10<sup>6</sup> (±2,7x10<sup>6</sup>)</b><br><b>1,8x10<sup>6</sup> (±2,6x10<sup>6</sup>)</b><br><b>2,7x10<sup>6</sup> (±3,3x10<sup>6</sup>)</b> | <b>1,7x10<sup>4</sup> (±2,4x10<sup>4</sup>)</b> |                   | <b>2,3 (±0,5)</b>  | <b>LF+LM</b>  | <b>Brasil</b>                    |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
| BRCFX    | 1,5x10 <sup>5</sup>                                                                                                                                    | 1,6x10 <sup>4</sup>                                                                                                                                   | 1,01x10 <sup>4</sup>                            | 1,0/0,2           | LAC+UV             | Brasil        | Dias <i>et al.</i> , 2022        |
|          | <b>1,0x10<sup>6</sup> (±1,5x10<sup>6</sup>)</b><br><b>6,5x10<sup>5</sup> (±6,5x10<sup>5</sup>)</b><br><b>6,3x10<sup>5</sup> (±6,6x10<sup>5</sup>)</b>  | <b>1,7x10<sup>4</sup> (±2,4x10<sup>4</sup>)</b>                                                                                                       |                                                 | <b>1,8 (±0,5)</b> | <b>LF+LM</b>       | <b>Brasil</b> | <b>Presente estudo</b>           |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
|          |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    |               |                                  |
| BRMRP    | 4,8x10 <sup>5</sup><br>Esgoto hospitalar*                                                                                                              |                                                                                                                                                       |                                                 |                   |                    | Singapura     | Le <i>et al.</i> , 2016          |



| Bactéria      | Esgoto Bruto (UFC/mL)                           | Esgoto Tratado (UFC/mL)                         | Efluente pós desinfecção (UFC/mL) | Remoção em log     | Tipo de tratamento | País          | Referência                   |
|---------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------|------------------------------|
| BR<br>TRIAZOL | <b>1,4x10<sup>5</sup> (±1,7x10<sup>5</sup>)</b> | <b>6,3x10<sup>3</sup> (±7,9x10<sup>3</sup>)</b> | 10 <sup>1</sup>                   | <b>1,19 (±1,0)</b> | <b>LF+LM</b>       | <b>Brasil</b> | <b>Presente estudo</b>       |
|               | <b>7,1x10<sup>4</sup> (±7,8x10<sup>4</sup>)</b> |                                                 |                                   |                    |                    |               |                              |
|               | <b>5,8x10<sup>4</sup> (±5,4x10<sup>4</sup>)</b> |                                                 |                                   |                    |                    |               |                              |
|               | 10 <sup>3</sup>                                 | 10 <sup>2</sup>                                 |                                   | 1,3                | LAC                | Brasil        | Machado <i>et al.</i> , 2022 |
|               | 10 <sup>3</sup>                                 | 10 <sup>3</sup>                                 |                                   | 0,3                | UASB+FBP           |               |                              |
|               | 10 <sup>4</sup>                                 | 10 <sup>1</sup>                                 |                                   | 2,3                | LA-RBN+FQ+UV       |               |                              |
|               | <b>9,9x10<sup>4</sup> (±1,6x10<sup>5</sup>)</b> | <b>5,7x10<sup>2</sup> (±9,5x10<sup>2</sup>)</b> | 10 <sup>1</sup>                   | <b>2,5 (±0,9)</b>  | <b>LF+LM</b>       | <b>Brasil</b> | <b>Presente estudo</b>       |
|               | <b>5,5x10<sup>4</sup> (±3,1x10<sup>4</sup>)</b> |                                                 |                                   |                    |                    |               |                              |
|               | <b>7,5x10<sup>4</sup> (±9,0x10<sup>4</sup>)</b> |                                                 |                                   |                    |                    |               |                              |

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL). FAS: Filtro Aerado Submerso; FBP: Filtro Biológico Percolador; FQ: Tratamento Físico-Químico; LA: Lodos Ativados; LAC: Lodos Ativados Convencional; LF + LM: Lagoa Facultativa e Lagoa de Maturação; UASB: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente; RBN: Remoção Biológica de Nutrientes; RSA: Radiação Solar Artificial. Resultados do presente estudo em negrito.

Como foi possível notar, a tabela acima também mostra informações acerca das concentrações médias (valores aproximados), assim como o desvio padrão, de BHTs e bactérias resistentes aos antibióticos (amoxicilina, azitromicina, cefalexina, meropenem e trimetoprim+sulfametoxazol) encontradas em afluentes e efluente no presente estudo para a região de Belo Horizonte/MG. Dessa forma, é possível entender melhor o efeito das diferentes tipologias de tratamento empregados nas ETEs sobre a redução da disseminação da resistência antimicrobiana, especificamente BHTs e BRAs neste tópico da pesquisa, analisando-se os valores das concentrações afluentes e efluentes. Os estudos envolvem países distintos, como Polônia, Portugal, China, Singapura, Austrália, Etiópia e Brasil.

Entre as concentrações observadas (Tabela 7), percebe-se que os valores médios obtidos nesta pesquisa estão próximos àqueles que foram reportados por Le *et al.* (2018), na China, e Makowska *et al.* (2016), na Polônia, apresentando pouca discrepância entre si. NOVO&MANAIA (2010), em Portugal, também obtiveram concentrações cujas diferenças também não se mostram muito altas. Os maiores valores são trazidos por Asfaw *et al.* (2017), na Etiópia, enquanto o menor valor é referente ao estudo de Glady-Croue *et al.* (2018), na Austrália, sendo  $1,9 \times 10^8$  UFCs/mL e  $1,1 \times 10^4$  UFCs/mL, respectivamente. Dessa forma, observa-se uma diferença aproximada de 1,6 log a menos nas concentrações médias reportadas neste estudo, em relação à concentração de Asfaw *et al.* (2017), que é proveniente de esgoto hospitalar. Ao se considerar o valor máximo obtido nas amostras de Belo Horizonte/MG, a diferença não é tão alta, visto que esta foi cerca de  $1,0 \times 10^8$  UFCs/mL. Quando comparado com Glady-Croue *et al.* (2018), nas amostras deste estudo, foram obtidas concentrações 2,64 log maiores, aproximadamente.

As concentrações que foram reportadas por Machado *et al.* (2022), com os valores encontrados no presente estudo, percebe-se um aumento de 0,9 a 1,15 unidades log na concentração média de BHTs. A pesquisa envolveu três pontos afluentes de amostragem na região metropolitana de Belo Horizonte/MG, com amostras coletadas durante o ano de 2019. Dias *et al.* (2022), por sua vez, encontrou valores médios maiores (cerca de 0,6 log) para a região de Ibirité/MG, comparando com esta pesquisa, para um ponto afluente durante o ano de 2019.

A abundância absoluta de bactérias resistentes à amoxicilina encontradas nesta pesquisa foi maior ao se comparar com os estudos. Nas amostras em Portugal e Austrália, observou-se valores aproximados de 0,3 e 3,0 log menores sobre os valores da pesquisa. Para a região de Belo Horizonte/MG, também foi notado um aumento nas concentrações médias destas BRAs de cerca de 1,0 log, comparadas com Machado *et al.* (2022). Ao se comparar com outra região de Minas Gerais (Ibirité), as concentrações médias encontradas neste trabalho foram de 0,5 log maior, em relação àquelas encontradas por Dias *et al.* (2022).

A concentração média de bactérias resistentes à cefalexina neste trabalho foi maior ao se comparar com a concentração média encontrada por Dias *et al.* (2022), sendo aproximadamente 0,7 log maior. Em Belo Horizonte, as bactérias resistentes à combinação de trimetoprim com sulfametoxazol também aumentaram sua concentração em 1 log, aproximadamente, em relação aos valores reportados por Machado *et al.* (2022).

Ressalta-se que os valores relativos às diferenças, que foram mencionados, são aproximados, em contraste com a média de todas as concentrações dos pontos afluentes desta pesquisa e aqueles que foram especificados em tabela. Não obstante, estes resultados apontando valores maiores de BRAs no esgoto bruto das regiões investigadas (coletados durante a pandemia, de outubro de 2021 a junho de 2022) comparados com os valores dos mesmos esgotos (amostrados em 2019), sugerem o impacto da pandemia no aumento da circulação e disseminação de BRAs no esgoto bruto. Através destas constatações, tem-se uma contribuição para a quantificação das bactérias resistentes aos antibióticos em esgotos sanitários e também dos diferentes efeitos que os sistemas de tratamento podem ter em relação a estes microrganismos.

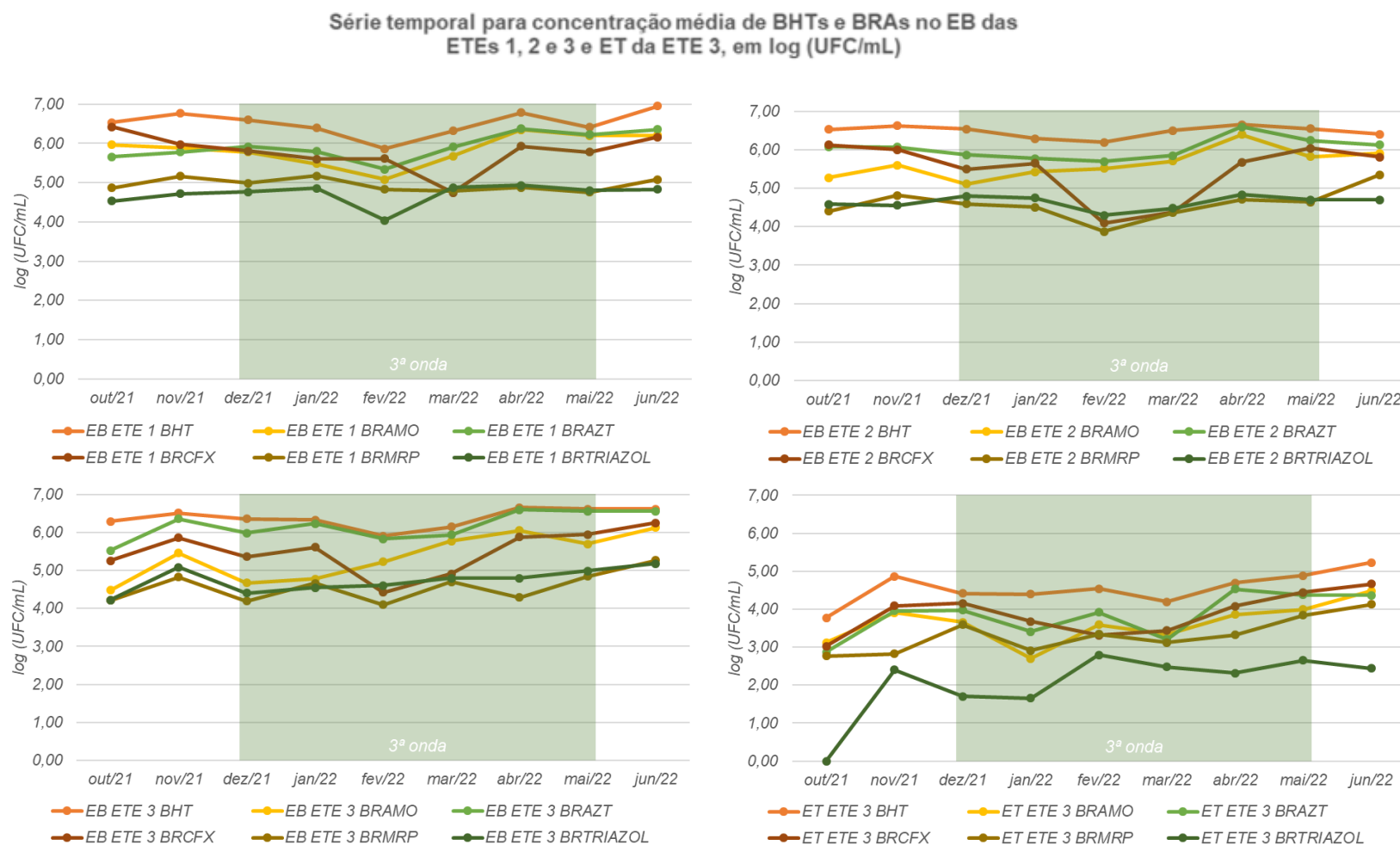
- Série temporal de BHTs e BRAs nos afluentes e efluente tratado estudados

A fim de se analisar melhor as concentrações de BHTs e BRAs encontradas nos afluentes das ETEs, assim como efluente tratado da ETE 3, foram elaborados os gráficos de série temporal para todas as concentrações médias mensais (mostradas na Figura 10). Para tal, considerou-se o período de estudo deste trabalho (outubro de 2021 a junho de 2022).

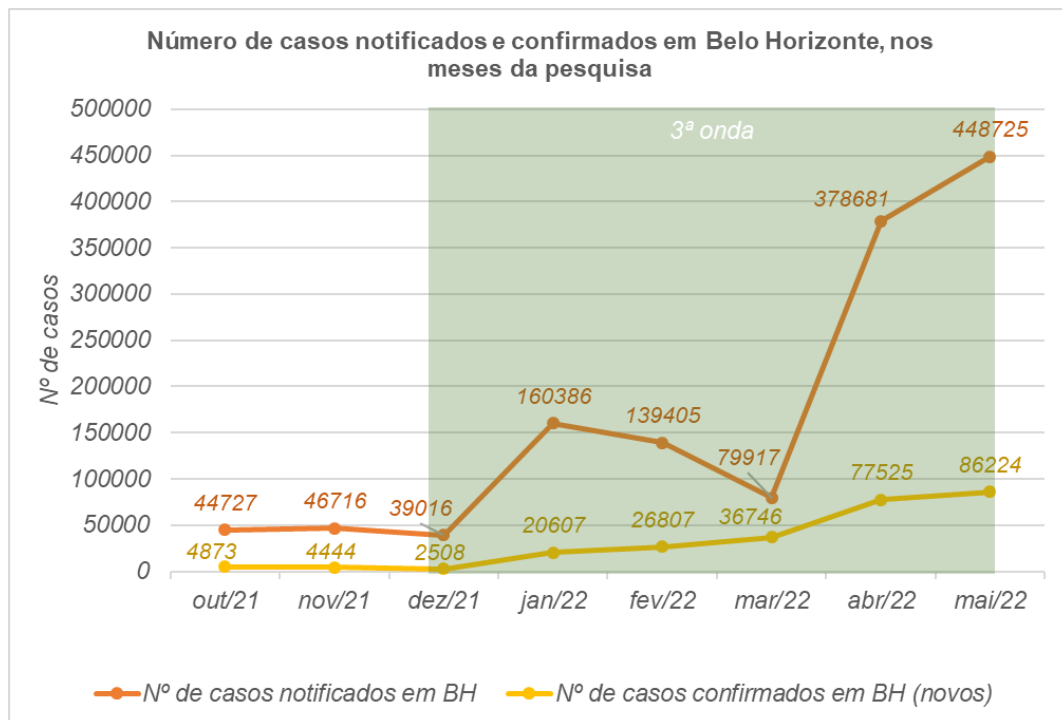
Além disso, foram consultados os dados referentes aos números de novos casos confirmados de COVID-19 na cidade de Belo Horizonte/MG, assim como o número de casos notificados na cidade, comparando-se com o período da onda da curva epidêmica nacional, ilustrados na Figura 11.

O número total de coletas e suas respectivas datas são detalhados na Tabela A1, do APÊNDICE A.

Figura 10 – Série temporal para a concentração média de BHTs e BRAs no EB e ET das ETEs estudadas, por mês, em log (UFC/mL)



**Figura 11 – Série temporal para o número de casos notificados e confirmados (novos) em BH/MG, entre outubro de 2021 e maio de 2022**



Out/21: 01/10/2021 a 01/11/2021; nov/21: 01/11/2021 a 01/12/2021; dez/21: 01/12/2021 a 03/01/2022; jan/22: 03/01/2022 a 01/02/2022; fev/22: 01/02/2022 a 01/03/2022; mar/22: 01/03/2022 a 01/04/2022; abr/22: 01/04/2022 a 03/05/2022; jun/22: 03/05/2022 a 03/06/2022.

Como os dados foram disponibilizados até o dia 03 de junho de 2022, não foi considerado o mês todo, visto que nesta pesquisa a última coleta foi em 03 de junho de 2022.

Fonte: PBH (2023).

Para melhor entendimento, essa quantidade média de semanas/coletas (visto que as coletas ocorreram semanalmente, sendo uma coleta a cada semana) por mês é resumida:

- Para EB da ETE 1: 1 semana para out/21, fev/22 e jun/22; 3 semanas para nov/21; 5 semanas para dez/21 (exceto BRAMO, sendo equivalente a 4 semanas); e 4 semanas para o restante dos meses (jan/22, mar/abr/mai/22);
- Para EB da ETE 2: 1 semana para out/21, fev/22 e jun/22; 3 semanas para nov/21 e jan/22 (exceto BHTs, sendo equivalente a 2 semanas somente em jan/22); 5 semanas para dez/21; e 4 semanas para o restante dos meses (mar/abr/mai/22);
- Para EB e ET da ETE 3: 1 semana para out/21, fev/22 e jun/22; 3 semanas para nov/21; 5 semanas para dez/21; e 4 semanas para o restante dos meses (jan/22, mar/abr/mai/22 – exceto BHTs, sendo equivalente a 3 semanas somente em jan/22).

Pode-se verificar que, apesar das concentrações variarem pouco ao longo do tempo (mantendo-se na mesma ordem de grandeza), houve tendência de aumento para as BHTs e bactérias resistentes à azitromicina, amoxicilina e cefalexina (em todas as ETEs), no período de janeiro a junho de 2022. Durante este período, observa-se também o aumento do número de casos de COVID-19 para a cidade de Belo Horizonte/MG (Figura 11), publicados pela Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), correspondendo ao período da terceira onda na curva epidêmica nacional, que durou de 26/12/2021 a 21/05/2022 (MOURA *et al.*, 2022).

O número de novos casos de COVID-19 começou a aumentar em dez/22, seguindo a 3ª onda. Nos meses de abril e maio de 2022, observou-se um maior aumento em relação aos outros meses. Analisando-se o número de casos notificados, esse aumento foi destacado também nestes meses (abr/mai/22), todavia, percebeu-se uma diminuição entre janeiro e março de 2022. Comparando-se com as concentrações de BHTs, em todos os pontos amostrais, estas tiveram aumento já no mês anterior (março). Isso também aconteceu para algumas bactérias resistentes, conforme especificado a seguir:

- Para as amostras do EB da ETE 1, observou-se que tanto BHTs quanto algumas das bactérias resistentes tiveram comportamento similar: durante os três primeiros meses da 3ª onda, as concentrações estavam reduzindo e passaram a aumentar, a partir de fev/22. Isso não é observado para BRCFX, que teve seu aumento a partir de abr/22, e para BRMRP, que apresentou uma leve diminuição em mar/22. Ou seja, BRAMO, BRAZT e BRTRIAZOL aumentaram suas concentrações já em mar/22, enquanto os casos notificados tiveram aumento significativo em abr/22, assim como BRMRP que também teve um aumento em mar/22.
- Analisando-se o EB da ETE 2, as concentrações também passaram a aumentar em mar/22 para BHTs, BRAZT, BRCFX, BRMRP E BRTRIAZOL. Para BRAMO, a diminuição da concentração se deu em dez/21, permanecendo com leve aumento durante a 3ª onda, e voltando a diminuir em mai/22. Essa diminuição na concentração, neste mês específico, também se deu para BHTs, BRAMO, BRAZT, BRTRIAZOL. Ou seja, também um mês antes do pico de

número de casos notificados, as concentrações de algumas bactérias resistentes e BHTs já estavam aumentando.

- Para o EB da ETE 3, também é observada uma redução da concentração em fev/22, para BHTs, BRAZT, BRCFX, BRMRP, que passam a aumentar a partir de mar/22. Já para BRTRIAZOL e BRAMO, essa redução não é observada, visto que BRTRIAZOL não tem diminuição e BRAMO permanece aumentando no decorrer dos meses da 3ª onda (até o mês de mai/22). Comparando com os novos números de casos notificados e casos confirmados de COVID-19, observou-se que, também, teve-se um aumento de BRAs e BHTs em mar/22.
- No ET da ETE 3, não se observa um comportamento similar, em relação ao mês de fev/22. As menores concentrações (durante o período da 3ª onda) se deram no mês de fev/22 somente para BRCFX. Todavia, para os meses de abr/mai/22, notou-se um aumento na concentração média de BHTs e BRAs, exceto para BRTRIAZOL que não aumento em abr/22, e BRAZT que diminuiu em mai/22.

Como mencionado, as concentrações não variaram muito, visto que muitas permaneceram na mesma ordem de grandeza ao longo do tempo de estudo e, além disso, para o mês de fevereiro de 2022 (quando muitas das amostras diminuíram sua concentração), houve somente uma semana/coleta, constando como um valor, não sendo uma média de todas as semanas, o que também pode influenciar no resultado. Não é possível averiguar as informações de forma exata, visto que a quantificação da concentração de antibióticos não é um alvo de estudo nesta pesquisa e não foram encontrados dados referentes ao consumo de antibióticos na cidade, assim como uma estimativa de vendas de antibióticos para Belo Horizonte no período da pesquisa. Todavia, pode-se supor que o aumento no consumo de antibióticos (como amoxicilina, azitromicina, cefalexina e sulfametoxazol+trimetoprim) influenciou na concentração de bactérias resistentes, no decorrer do estudo. Conforme comentado, no período anterior ao mês cujo número de casos notificados teve um pico de aumento, observou-se que as concentrações de bactérias resistentes já estavam aumentando, mesmo permanecendo na mesma ordem de grandeza.

Isso sugere que, com o agravamento da pandemia e maior uso de antibióticos, o aumento na disseminação e surgimento de resistência a antibióticos pode ter sido



induzido, já que também houve aumento na concentração de BRAs circulando no esgoto de Belo Horizonte/MG.

## **5.2 Identificação dos isolados de BHTs e BRAs em amostras de EB e ET coletadas em três regiões distintas na região metropolitana de Belo Horizonte, MG**

Foram isoladas 254 cepas e, destas, foram identificadas cerca de 109 cepas de bactérias resistentes, pela técnica Maldi-tof. A Tabela D1 (APÊNDICE D) traz dados referentes às bactérias que foram isoladas e identificadas, sendo separadas por filo, família e espécie, especificando a qual tipo de antibiótico determinada bactéria apresentou resistência, tanto para as amostras afluentes às três ETEs quanto para o efluente tratado da ETE 3.

Explorando os dados em cada ETE, no afluente da ETE 1 o gênero encontrado em maior quantidade entre os isolados identificados foi *Escherichia* (19%), seguido por *Klebsiella* (14%), *Wautersiella* (14%), *Aeromonas* (9%), *Pseudomonas* (9%), *Stenotrophomonas* (9%), *Enterobacter* (5%), *Elizabethkingia* (5%), *Microbacterium* (5%), *Providencia* (5%) e *Staphylococcus* (5%).

No afluente da ETE 2, os gêneros mais frequentemente encontrados nos isolados identificados foram *Enterobacter* (18%), *Escherichia* (14%), *Klebsiella* (14%) e *Stenotrophomonas* (11%), além de *Pseudomonas* (7%), *Citrobacter* (7%), *Aeromonas* (7%), *Raoultella* (4%), *Sphingobacterium* (4%), *Streptococcus* (4%), *Acinetobacter* (4%), *Wautersiella* (4%) e *Chryseobacterium* (4%).

Finalmente, no afluente da ETE 3, o gênero mais abundante foi *Escherichia* (26%) e, posteriormente, *Pseudomonas* (16%), *Citrobacter* (13%), *Chryseobacterium* (7%), *Enterobacter* (7%), *Providencia* (7%), *Wautersiella* (7%), *Elizabethkingia* (3%), *Enterococcus* (3%), *Klebsiella* (3%), *Kluyvera* (3%), *Micrococcus* (3%) e *Morganella* (3%).

No efluente tratado da ETE 3, *Enterobacter* (24%) foi o gênero mais abundante, seguido por *Pseudomonas* (17%), *Stenotrophomonas* (14%), *Acinetobacter* (10%), *Aeromonas* (10%), *Escherichia* (10%), *Kluyvera* (4%), *Chryseobacterium* (4%), *Providencia* (4%) e *Wautersiella* (4%).

As espécies *Enterobacter asburiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas otitidis* e *Wautersiella falsenii* resistentes foram encontradas em todos os pontos, resistentes a pelo menos um dos 5 antibióticos testados, enquanto *Klebsiella pneumoniae* foi reportada no esgoto bruto das três ETES.

Especificamente, *Enterobacter asburiae* foi identificada como resistente à trimetoprim+sulfametoxazol em amostra de afluente (ETE 1), amoxicilina em afluente (ETE 2) e efluente (ETE 3), à cefalexina no afluente e efluente (ETE 3), e à azitromicina no efluente (ETE 3). *Escherichia coli* foi reportada como resistente a todos os antibióticos, sendo amoxicilina em amostras afluentes (ETEs 1 e 3), azitromicina em afluente (ETE 1), cefalexina em afluentes (ETEs 2 e 3), meropenem no efluente (ETE 3) e trimetoprim+sulfametoxazol em afluente (ETEs 1 e 3) e efluente (ETE 3). A espécie *Pseudomonas otitidis*, por sua vez, apresentou resistência à amoxicilina em amostras de esgoto bruto (ETEs 2 e 3), cefalexina em esgoto bruto (ETE 1) e efluente tratado (ETE 3) e meropenem em esgoto bruto (ETE 2) e efluente tratado (ETE 3).

*Klebsiella pneumoniae*, um patógeno de importância médica, foi identificada como resistente em todas as amostras de esgoto bruto, à amoxicilina (ETEs 1, 2 e 3) e cefalexina (ETE 1). Ambos os antibióticos são inclusos na classe dos  $\beta$ -lactâmicos, estando nos grupos penicilina semi-sintética e cefalosporinas, respectivamente.

De acordo com a lista de prioridades globais para bactérias patogênicas resistentes à antibióticos que apresentam ameaça à saúde global, publicada pela OMS em 2017, bactérias da família *Enterobacteriaceae* com resistência a carbapenemases e cefalosporinas de terceira geração estão listadas como de importância crítica. Neste estudo, certas bactérias pertencentes a esta família, como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas otitidis*, *Pseudomonas monteilii* e *Escherichia coli* foram detectadas em esgoto bruto e tratado sendo resistentes a meropenem, pertencente ao grupo dos carbapenêmicos ( $\beta$ -lactâmicos).

Ao considerar a lista de prioridades globais estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), diversos estudos têm abordado a presença de bactérias de interesse dessa lista em amostras de esgotos sanitários. Em estudo conduzido por Nnadozie *et al.* (2017), foram compilados dados de pesquisas realizadas em diferentes regiões do mundo, destacando-se a detecção de bactérias como

*Escherichia coli*, *Serratia* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella* spp. e *Shigella flexneri*, membros da família Enterobacteriaceae, e *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudomonadaceae), *Mycobacterium tuberculosis* (Mycobacteriaceae), *Enterococcus faecium* e *Enterococci faecalis* (Enterocacaceae), *Staphylococcus aureus* (Staphylococaceae) e *Vibrio cholerae* (Vibrionaceae), em esgotos brutos e efluentes tratados.

Já em estudo mais recente, realizado por Machado *et al.* (2022) em ETEs na região de Belo Horizonte, também foram observadas bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococci faecalis*, tanto em amostras de esgoto bruto quanto em efluentes tratados. Essas bactérias apresentaram resistência a antibióticos e/ou características de multirresistência. Esses estudos evidenciam a presença de bactérias de importância clínica e seu potencial de disseminação através do sistema de esgoto. A detecção dessas bactérias, mesmo em efluentes tratados, ressalta a necessidade de medidas adicionais para controlar a resistência antimicrobiana e reduzir o risco para a saúde pública e o meio ambiente.

Ao se comparar o esgoto bruto da ETE 3 com o efluente tratado, percebe-se que houve alteração no perfil dos isolados resistentes. Isso indica que o sistema de tratamento altera a comunidade de bactérias resistentes, podendo este fato ser constatado também a partir do aumento da prevalência de determinadas BRAs no ET (especificamente bactérias resistentes à amoxicilina, cefalexina e meropenem, que tiveram aumento na prevalência de resistência no efluente tratado). Logo, apesar de haver considerável remoção de BRAs no sistema composto por lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação, houve seleção para alguns grupos resistentes.

Munk *et al.* (2022), por meio de análise metagenômica, encontraram 969 gêneros bacterianos diferentes nas 757 amostras de esgoto, coletadas em 243 cidades de 101 países diferentes, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Dentre estes gêneros, estão inclusos *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Acidovorax* e, entre os vinte gêneros mais comumente encontrados entre as amostras, estavam outros com potencial patogênico, como *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Neisseria*.

Alguns destes gêneros também foram encontrados no esgoto bruto e efluente desta pesquisa.

Machado *et al.* (2022), estudaram três ETEs na região de Belo Horizonte/MG, entre os anos de 2017 e 2018. Identificaram no esgoto bruto da ETE A, os gêneros *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*; na ETE B, os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter*; já na ETE C, os principais gêneros foram *Escherichia*, *Bacillus*, *Shigella*, *Chryseobacterium* e *Enterobacter*, assim como *Acinetobacter*. Os esgotos brutos das ETEs A e B (estudadas pelos autores), correspondem aos mesmos esgotos brutos das ETEs 1 e 2 desta pesquisa, em períodos distintos. No efluente tratado, por sua vez, os autores identificaram *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Salmonella*.

Em suma, nos esgotos bruto investigados (das 3 ETEs) e no efluente tratado da ETE 3, detectou-se gêneros de bactérias do grupo ESKAPE (são seis patógenos considerados prioritários pela OMS: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*) como sendo resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados.

### **5.3 Antibiograma dos isolados de BRAs das amostras de EB e ET para verificação de multirresistência (Multidrug resistance – MDR)**

Como citado anteriormente no item 4.4, para análise dos isolados em relação ao perfil de resistência a antibióticos, para averiguar a possibilidade de multirresistência, foi utilizado como base os diagnósticos microbiológicos especializados (MDE – BRCast 2022). Dessa forma, aquelas bactérias que apresentaram resistência a mais de três classes de antibióticos diferentes, são consideradas como multirresistentes (MDR). Foram investigadas oito classes de antibióticos, sendo eles:  $\beta$ -lactâmicos (AMO, AMC, IPM, MPM, ERT), cefalosporinas (CFE), aminoglicosídeos (EST), tetraciclina (TET), quinolonas (CIP), sulfonamidas (SUT), anfenicóis (CLO) e macrolídeos (AZT, ERI). A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos, sendo a resistência representada pelo ponto, para cada colônia identificada e amostra pertencente.

**Tabela 8 – Características dos isolados em relação à origem e perfil de resistência a antibióticos**

| Espécie                                 | AMO | AMC | ERI | AZT | CLO | CIP | CFE | EST | IPM | ERT | MPM | SUT | TET |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>EB ETE 1</b>                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (1)             | •   | •   |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)        | •   | •   |     |     |     |     | •   | •   | •   | •   |     | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (2)             | •   |     |     |     |     |     |     | •   |     |     |     | •   | MDR |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>       | •   | •   | •   |     |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)        | •   | •   |     |     |     |     | •   |     | •   | •   | •   |     | MDR |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)        | •   | •   |     |     |     |     | •   |     | •   | •   |     |     | MDR |
| <i>Enterobacter asburiae</i>            | •   | •   |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <b>EB ETE 2</b>                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (1)        | •   | •   |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>               | •   | •   |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>          |     |     |     |     |     | •   |     |     | •   |     | •   |     | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (1)             | •   | •   |     | •   | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   | -   |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (2)        | •   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | MDR |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (1)         | •   | •   |     |     |     | •   | •   | •   |     | •   |     | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (2)             | •   | •   | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (2)         | •   | •   | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (3)             | •   | •   |     |     | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (4)             | •   |     |     |     | •   |     |     | •   |     |     |     | •   | MDR |
| <b>EB ETE 3</b>                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Escherichia coli</i> (1)             | •   | •   |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (2)             | •   | •   |     |     |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (1)        | •   | •   |     |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (3)             | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (4)             | •   | •   | •   |     | •   | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Escherichia coli</i> (5)             | •   | •   |     |     |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (2)        | •   | •   | •   | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Pseudomonas monteilii</i>            |     |     |     |     |     | •   |     |     |     |     |     |     | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (6)             | •   |     | •   |     | •   | •   | •   | •   |     | •   | •   | •   | MDR |
| <b>ET ETE 3</b>                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <i>Pseudomonas otitidis</i> (1)         |     |     |     |     |     | •   |     |     |     |     |     |     | -   |

| Espécie                                 | AMO | AMC | ERI | AZT | CLO | CIP | CFE | EST | IPM | ERT | MPM | SUT | TET |     |
|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Enterobacter asburiae</i> (1)        | •   | •   |     |     |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (1)         | •   | •   |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (2)        | •   | •   |     | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Pseudomonas otitidis</i> (2)         |     |     |     |     |     | •   |     |     |     |     |     |     |     | -   |
| <i>Pseudomonas fulva</i>                |     |     |     |     |     | •   |     |     |     |     |     |     |     | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (1)             | •   | •   | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   |     | -   |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   |     | -   |
| <i>Enterobacter asburiae</i> (3)        | •   | •   | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (2)         | •   | •   |     |     |     |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (3) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | •   |     | -   |
| <i>Escherichia coli</i> (2)             | •   | •   | •   |     | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | •   | MDR |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i>          |     |     |     |     |     | •   |     |     |     |     |     |     |     | -   |

Tracejadas: representam cepas que foram resistentes a mais antibióticos no ET da ETE 3, ao se comparar com o EB da ETE 3

Conforme pode ser observado, 12 bactérias não apresentaram multirresistência, das 43 cepas que foram selecionadas para o teste. Isso significa que 72,1% das cepas foram multirresistentes aos antibióticos analisados. No esgoto bruto da ETE 3, *Escherichia coli* apresentou resistência a todos os antibióticos estudados.

Ao se observar as cepas que foram resistentes a dez ou mais antibióticos, nota-se que 18 se enquadram nessa classe, correspondendo a cerca de 42% das cepas.

Amador *et al.* (2015) também reportaram que muitos isolados da família Enterobacteriaceae, vindos de amostras de ETE, foram resistentes e até mesmo multirresistentes a parte dos antibióticos estudados nesta pesquisa, como amoxicilina, sulfametoxazol+trimetoprim, ciprofloxacina e tetraciclina.

Importante destacar, por esta tabela, que nos esgotos brutos, verificou-se ao menos 4 gêneros de bactérias pertencentes ao grupo ESKAPE (lista dos seis patógenos prioritários definidos pela OMS), com fenótipo MDR, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*; enquanto no efluente tratado foram dois gêneros desta lista com fenótipo MDR (*Enterobacter cloacae* e *Enterobacter asburiae*).

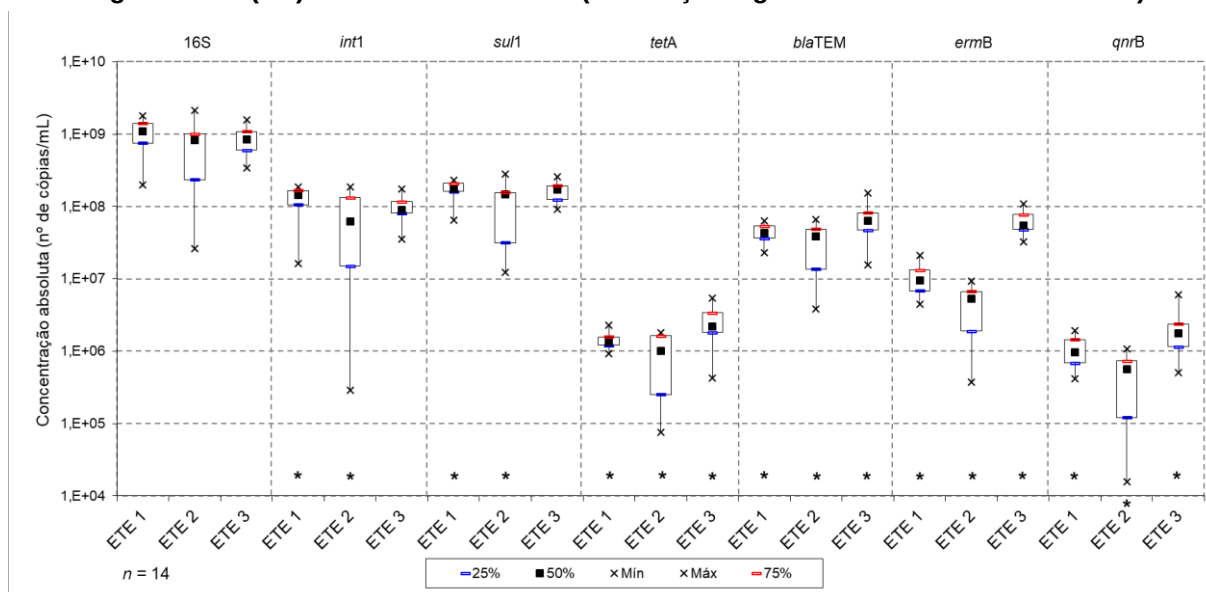
## 5.4 Ocorrência e prevalência de elementos genéticos de resistência a antibióticos nas ETEs estudadas

### 5.4.1 Concentrações absolutas e relativas dos elementos genéticos pesquisados nos esgotos das ETEs

Os resultados observados neste trabalho estão mostrados na Tabela E1 (APÊNDICE E), durante todo o período de amostragem especificado, relativos à abundância dos elementos genéticos alvo da pesquisa (RNAr 16S, *int1*, *sul1*, *tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*), tanto nas amostras afluentes às três ETEs quanto no afluente da ETE 3. Nesta tabela também estão inclusos dados relativos aos valores de *Threshold*, eficiência de reação, equação da reta e o coeficiente  $r^2$ . Foram ponderados os resultados das corridas de qPCR com percentuais entre 92-124%, correlacionando com o coeficiente  $r^2$ , sendo este de no mínimo 0,990.

Na Figura 12 pode-se visualizar a abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes investigados neste estudo, para o esgoto bruto das três ETEs, enquanto os resultados para a estatística descritiva estão na Tabela F1 (APÊNDICE F). Optou-se pela utilização do gráfico *box-plot* para melhor percepção dos dados e seu comportamento.

**Figura 12 – Abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes investigados, nas amostras de esgoto bruto (EB) das ETEs em estudo (diferenças significativas assinaladas com \*)**



A abundância absoluta média para bactérias totais (RNAr 16S) foi a maior entre todos os elementos, para as três ETEs ( $1,1 \times 10^9$ ,  $8,3 \times 10^8$  e  $8,7 \times 10^8$  cópias/mL, respectivamente), seguido dos genes de resistência à sulfonamidas (*sul1*) e *integron*

da classe 1 (*int1*), correspondendo à:  $1,8 \times 10^8$ ,  $1,2 \times 10^8$  e  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL – *sul1*;  $1,3 \times 10^8$ ,  $7,9 \times 10^7$  e  $9,8 \times 10^7$  cópias/mL. Já as menores abundâncias foram referentes ao gene de resistência a quinolonas (*qnrB*) e tetraciclinas (*tetA*), para as três ETEs ( $1,1 \times 10^7$ ,  $4,8 \times 10^5$  e  $2,1 \times 10^6$  cópias/mL – *qnrB*,  $1,5 \times 10^6$ ,  $9,8 \times 10^5$  e  $2,5 \times 10^6$  cópias/mL – *tetA*, respectivamente).

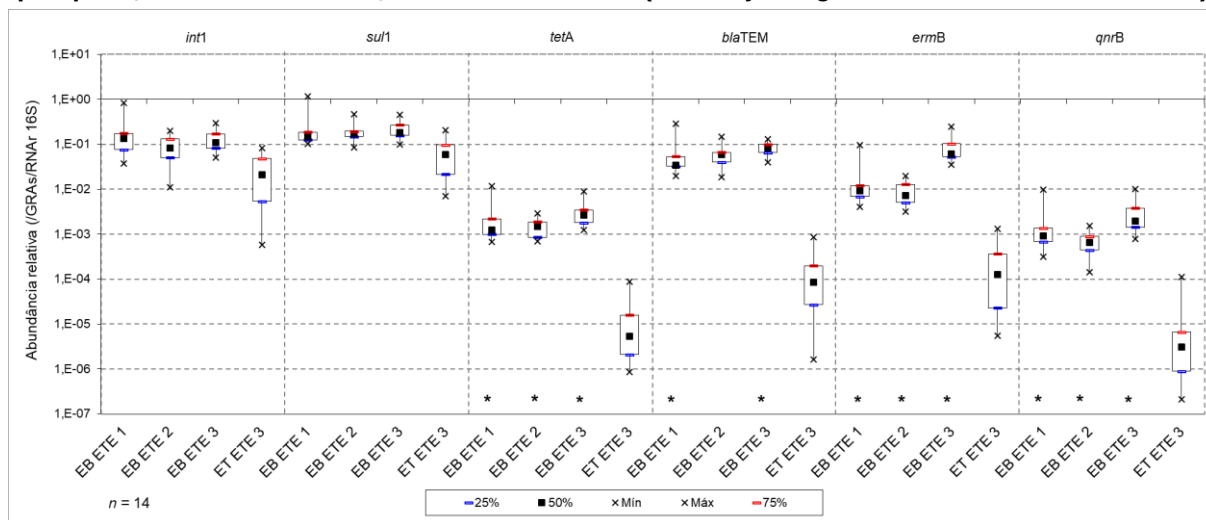
Em relação ao gene *sul1*, sabe-se que está contido em *integrons* de classe 1 (*int1*), devido à inserção em *int1*-Tn402 ao longo do período evolutivo. Isso explica as abundâncias similares para ambos os genes e, além disso, estes foram recentemente considerados como indicadores de poluição por GRAs, BRAs e outros poluentes antropogênicos (GILLINGS et al., 2015). Além disso, os dois genes são ubíquos em ambientes aquáticos, estando intimamente relacionados. O aumento na concentração de GRAs pode estar associado, possivelmente, com um maior uso de antibióticos pela população, de forma geral. Além disso, a maior abundância dos genes *sul1* e *int1* também podem indicar a presença de outros GRAs, além dos que foram medidos. Contudo, é importante frisar que o efeito dos antibióticos, e sua relação com os genes, não pode ser efetivamente comprovado nesta pesquisa, assim como o aumento no consumo destes, visto que não foram o foco do estudo e não foram medidos. Inclusive, McConnell et al. (2018) não observaram correlação entre os GRAs e os antibióticos aos quais cada um confere resistência, mas outros estudos encontraram correlação, como Rodriguez-Mozaz et al. (2015) e Gao et al. (2015).

Ao se estudar a Figura 12, é possível constatar que, para a ETE 2, a abundância absoluta de todos os elementos genéticos analisados é mais dispersa, principalmente para os valores abaixo do segundo quartil (mediana). A partir dos testes não paramétricos, observou-se diferenças significativas em 6 dos 7 elementos de resistência estudados (*int1*, *sul1*, *tetA*, *bla*TEM, *ermB* e *qnrB*), para um nível de significância igual a 5% ( $\alpha = 0,05$ ), tais resultados se encontram na Tabela F2 (APÊNDICE F). Logo, somente para a abundância do gene RNAr 16S obteve-se semelhança entre as três ETEs, visto que para os demais houve diferença significativa em função do tipo de esgoto coletado (sendo ETEs diferentes, que representam populações contribuintes distintas e bacias de esgotamento sanitário diferentes).



Também foi avaliada a abundância relativa dos elementos genéticos de resistência. Por meio dessa análise, é possível observar a concentração de GRAs e *int1* em relação à população bacteriana total (gene RNAr 16S). Os resultados reportados, em nº de cópias/mL, dos elementos genéticos pelo número de cópias do gene RNAr 16S (GRAs/RNAr 16S), são apresentados na Figura 13.

**Figura 13 – Gráfico *box-plot* de abundância relativa (GRAs/RNAr 16S) dos genes alvo da pesquisa, no EB das ETES 1, 2 e 3 e ET da ETE 3 (diferenças significativas assinaladas com \*)**



A estatística descritiva referente à abundância relativa dos genes alvo da pesquisa (*int1* e GRAs) se encontra na Tabela F3 (APÊNDICE F), enquanto os testes não paramétricos para se analisar as diferenças estatisticamente significativas estão na Tabela F4 (APÊNDICE F). Como exposto no gráfico e relatado na tabela, as maiores abundâncias relativas foram para os genes *sul1*, *int1* e *blaTEM* ( $2,6 \times 10^{-1}$ ,  $1,9 \times 10^{-1}$  e  $2,2 \times 10^{-1}$  nº de cópias/RNAr 16S – *sul1*;  $1,8 \times 10^{-1}$ ,  $9,1 \times 10^{-2}$  e  $1,31 \times 10^{-1}$  nº de cópias/RNAr 16S – *int1*;  $6,6 \times 10^{-2}$ ,  $6,2 \times 10^{-2}$  e  $8,2 \times 10^{-2}$  nº de cópias/RNAr 16S – *blaTEM*), enquanto as menores foram para os genes *ermB*, *tetA* e *qnrB*, respectivamente ( $1,7 \times 10^{-2}$ ,  $8,8 \times 10^{-3}$  e  $8,4 \times 10^{-2}$  nº de cópias/RNAr 16S – *ermB*;  $2,3 \times 10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$  e  $3,0 \times 10^{-3}$  nº de cópias/RNAr 16S – *tetA*;  $1,7 \times 10^{-3}$ ,  $6,8 \times 10^{-4}$  e  $2,8 \times 10^{-3}$  nº de cópias/RNAr 16S – *qnrB*), ao se considerar o esgoto bruto das três ETes.

Nota-se, também, que para os genes *int1* e *sul1* não foram observadas diferenças significativas entre os esgotos brutos (para um nível de significância igual a 5% -  $\alpha = 0,05$ ), o que sugere que a taxa equivalente desses genes, relacionadas ao gene do domínio Bacteria (RNAr 16S), foram semelhantes para os três tipos de esgotos, mesmo estes pontos estando localizados em diferentes regiões de Belo Horizonte,

com características e bacias distintas, especialmente para a ETE 3, cujo esgoto é proveniente de um aeroporto internacional, com maior circulação de pessoas de diversas regiões do país e do mundo. A ETE 1 é responsável pelo tratamento de efluentes, predominante de origem doméstica, provenientes de uma população com poder aquisitivo médio/alto. Além disso, a estação também recebe contribuições de efluentes líquidos industriais de diferentes setores (COPASA, 2017). Já a ETE 2 é caracterizada por receber efluentes, em sua maior parte, de origem doméstica, oriundos de população com poder aquisitivo baixo/médio, assim como parcelas de esgoto industriais, lodo de tanque séptico e lixiviado de aterro sanitário (GONÇALVES *et al.*, 2015; SILVA, 2009).

Para os outros GRAs, foi encontrada diferença significativa entre as três ETEs (exceto ETE 2 para o gene *blaTEM*), considerando-se um nível de significância igual a 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Tal diferença permite inferir acerca das características dos três tipos de esgotos, especificamente relacionadas aos GRAs. Em todos estes GRAs (*tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*), a concentração relativa foi significativamente maior para o afluente da ETE 3, que é constituída por esgoto de um aeroporto internacional. Isso mostra que a concentração destes genes, em relação às bactérias totais (RNAr 16S) foi maior neste local, sendo menor no efluente da ETE 1.

Para o efluente tratado, percebe-se que as menores concentrações médias relativas se deram para os genes *ermB*, *blaTEM*, *tetA* e *qnrB* ( $2,8 \times 10^{-4}$  n° de cópias/RNAr 16S – *ermB*;  $1,9 \times 10^{-4}$  n° de cópias/RNAr 16S – *blaTEM*;  $1,7 \times 10^{-5}$  n° de cópias/RNAr 16S – *tetA*;  $1,2 \times 10^{-5}$  n° de cópias/RNAr 16S – *qnrB*), percebendo-se que estes obtiveram grande amplitude interquartil, o que mostra grande dispersão nas concentrações efluentes. Tal resultado indica que, possivelmente, a comunidade microbiana (indicada pelas cópias do gene RNAr 16S) e bactérias resistentes a antibióticos diminuiram suas taxas equivalentes na fase líquida do tratamento, mostrando eficiência do sistema de tratamento na remoção destes genes.

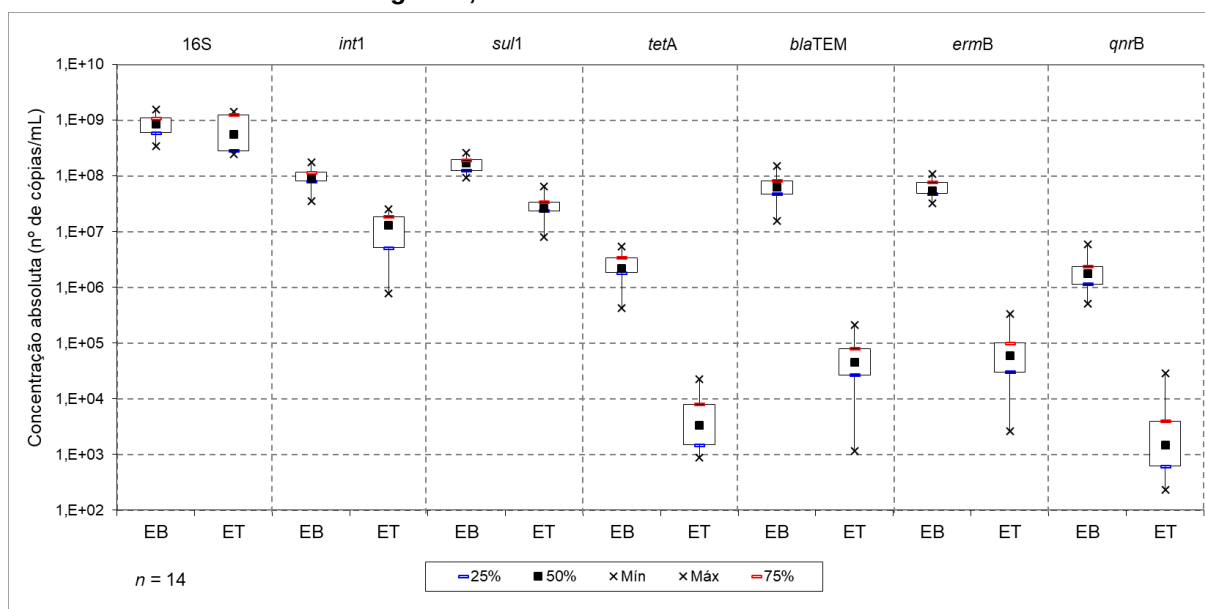
Ao longo dos anos, as estratégias principais para a redução da resistência antimicrobiana têm se concentrado na redução do uso de antimicrobianos, principalmente. Todavia, essas estratégias surtem menor efeito nos genes de resistência que são transferidos horizontalmente, por intermédios dos EGMs. Como

já dito, outros fatores relacionados à transmissão, como controle de infecção, saneamento, acesso a água limpa, acesso a antimicrobianos de qualidade e diagnósticos garantidos, bem como viagens e migração, também são considerados contribuintes significativos para a RAM (HENDRIKSEN *et al.*, 2019).

#### 5.4.2 Investigação da ocorrência e remoção de elementos de resistência a antibióticos em sistema de lagoa facultativa seguido por lagoa de maturação (ETE 3)

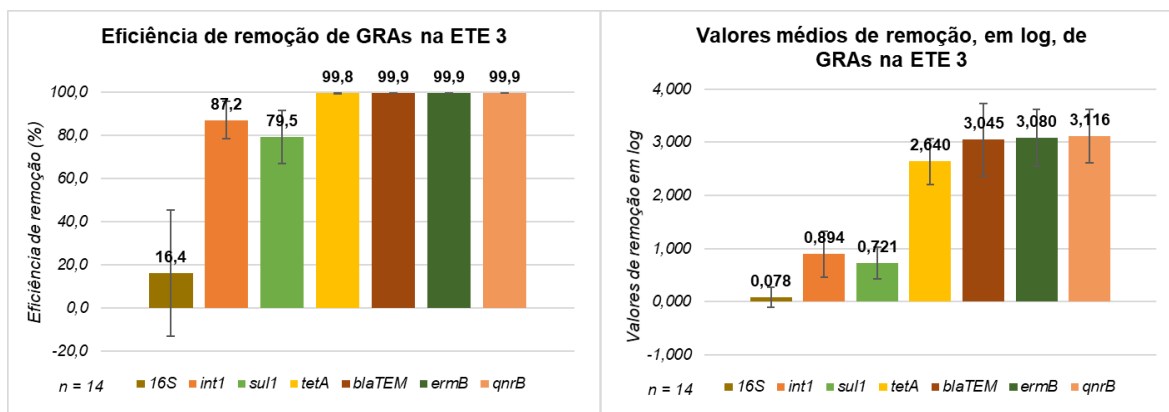
Na Figura 14 tem-se a abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes para a ETE 3, tanto esgoto bruto quanto efluente tratado. Os maiores valores de remoção encontrados foram para os genes de resistência aos grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro (*blaTEM*), macrolídeos (*ermB*), quinolonas (*qnrB*) e tetraciclina (*tetA*), sendo maiores que aqueles reportados pela literatura.

**Figura 14 – Gráfico *box-plot* da abundância absoluta (nº de cópias/mL) dos genes investigados, nas amostras de EB e ET da ETE 3**



Como mostra a Figura 15, os menores valores de remoção foram para sulfonamidas (*sul1*), *integrans* de classe 1 (*int1*), correspondendo a 0,89 log e 0,72 log, respectivamente. *Integrans* de classe 1 (*int1*) e genes de resistência à sulfonamidas (*sul1*) foram recentemente propostos como indicadores de poluição por GRAs, BRAs e outros poluentes antropogênicos (GILLINGS *et al.*, 2015). Tais dados podem ser encontrados na Tabela G1 (APÊNDICE G), com a análise mensal de eficiências de remoção e remoção em log.

**Figura 15 – Eficiência de remoção (%) média e valores médios de remoção, em log, de elementos de resistência aos antibióticos na ETE 3**



Makowska *et al.* (2016) investigaram estação de tratamento de águas residuárias, cujo sistema é de lodos ativados, compreendendo remoção de fósforo seguido de desnitrificação e nitrificação. Neste estudo, o valor de remoção médio para o gene RNAr 16S foi igual a 3,0 log, indicando que o sistema foi capaz de remover uma boa porção de bactérias totais. Para os genes *int1*, *sul1* e *tetA*, os valores médios de remoção foram de 1,0 log, 0,7 log e 0,7 log, respectivamente. Nesta pesquisa, o sistema de lagoa facultativa e lagoa de maturação (LF+LM) estudado foi capaz de remover valores médios próximos para os genes *int1* e *sul1* (0,9 e 0,7 log, respectivamente). Contudo, ao se analisar a remoção de *tetA* (2,6 log), o sistema de lagoas removeu uma parcela maior do que o sistema de lodos ativados, apresentando diferença de cerca de duas ordens de grandeza. Em relação à remoção de bactérias totais (RNAr 16S), a remoção de LF+LM foi 2,9 log inferior. No trabalho de McConnell *et al.* (2018) investigando 2 ETEs com tratamento terciário no Canadá, uma com lagoas aeradas e outra com sistema de lodos ativados modificado (com remoção de nutrientes), verificou-se remoção de GRAs da ordem de 1,77 e 2,6 log, respectivamente, para os sistemas biológicos; não houve remoção a partir da desinfecção com UV. Portanto, a ETE com sistema de lagoa aerada, removeu quantidade menor de GRA, quando comparado as lagoas do presente estudo (com remoção de 2 a 3,0 unidades log).

Na pesquisa feita por SANTOS (2021), foram investigados três sistemas de tratamento distintos: 1) sistema é de *Wetlands* construídas (ETE-WC); 2) reator UASB seguido de lagoas de alta taxa, (ETE-UASB+LA); e 3-) sistema composto por UASB, seguido de filtro biológico percolador e desinfecção por UV (ETE-UASB+FBP+UV).

Diante dos valores de remoção reportados pela autora, para todas as ETES, o valor médio de remoção do gene RNAr 16S foi maior em relação aos valores encontrados para o sistema de LF+LM, mostrando uma diferença entre 0,4 e 1,0 log. Para os genes *int1* e *blaTEM*, o sistema de UASB+LAT também obtiveram um maior valor de remoção, sendo 0,6 e 0,4 log, para cada gene, respectivamente. O tipo de tratamento composto por WC e UASB+LAT não foi capaz de remover o gene *su1*. Todas as ETES apresentaram valores médios de remoção menores que os valores reportados neste estudo para o gene *tetA*, variando de 1,5 a 2,5 log de diferença. Por fim, WC e UASB+FBP+UV removeram cerca de 2,1 e 1,1 log a menos que o sistema de LF+LM.

Leroy-Freitas *et al.* (2022) analisaram três ETES, na região de Belo Horizonte/MG. A primeira ETE é composta por lodos ativados convencionais (ETE-LAC); a segunda por um sistema UASB seguido de filtro biológico percolador (ETE-UASB+FBP); e, por fim, tem-se a terceira ETE, constituída por lodos ativados, com remoção biológica de nutrientes e processo físico-químico seguido por desinfecção com UV (ETE-LA-RBN+FQ+UV). Ao se comparar os valores médios de remoção reportados pelos autores, UASB+FBP foi maior que os valores médios encontrados neste estudo, para o gene RNAr 16S, com uma diferença ligeiramente menor (0,4 log). Para todos os outros sistemas de tratamento, a remoção do sistema foi inferior à remoção de LF+LM. Em destaque, percebe-se que, os valores médios de remoção de: UASB+FBP e LA-RBN+FQ foram 2,1 e 2,2 log menores para *tetA*; LAC, UASB+FBP e UASB-RBN+FQ foram menores para *blaTEM*, *ermB* e *qnrB* (variando de 1,6 até 2,4 log de diferença). No sistema LAC, por sua vez, não foi evidenciada remoção para os genes *su1* e *tetA*. Tais valores são mostrados mais detalhadamente na Tabela 9, no item 5.4.3.

Em ambos os trabalhos comentados, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em Microbiologia de águas residuárias e aplicada da UFMG, em ETES situadas na região metropolitana de Belo Horizonte/MG, houve momentos em que a remoção foi negativa, ou seja, a abundância de genes aumentou após o tratamento, como é o caso dos genes RNAr 16S e *qnrB*, para o sistema lodos ativados (LEROY-FREITAS *et al.*, 2022) e *su1* para os sistemas *Wetlands* e UASB+LAT (SANTOS, 2021).

Assim, tem-se que o processo de tratamento de lagoa facultativa, seguido por lagoa de maturação, foi eficiente na remoção de genes de resistência, especialmente ao se

comparar com outros tipos de tratamento, apresentando eficiências de remoção de até 99,9%. Mesmo para o gene *sul1*, cuja eficiência de remoção foi a menor entre os GRAs estudados (79,5%), percebeu-se remoção média de 0,7 log. Ao se comparar com *wetlands* construídas, cujos valores médios de remoção foram menores que 1,0 log, a eficiência de remoção de LF+LM se mostra alta. Comparando com o trabalho de McConnell et al. (2018), em ETE contendo lagoas aeradas seguido de desinfecção por UV, cuja remoção de ARGs foi de 1,77 logs, percebe-se que os valores de remoção determinados no presente estudo foram maiores, evidenciando a eficácia do tratamento biológico na remoção desses elementos de resistência.

Fatores como a idade do lodo e tempo de detenção hidráulica podem interferir no contato entre os microorganismos, o que pode acarretar maior ou menor transferência de genes de resistência, além de proximidade entre os organismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica e BRAs e GRAs. No processo deste estudo, tem-se um maior tempo de detenção hidráulica, maior contato com radiação solar, especialmente na lagoa de maturação, cujo principal objetivo é a remoção de patógenos de uma maneira mais econômica. Além disso, sabe-se que entre as ETEs existentes no país, prioriza-se a remoção de matéria orgânica e sólidos, com o intuito de se atender aos padrões mínimos de lançamento (VON SPERLING, 2016).

Logo, embora as ETEs não tenham sido projetadas com o objetivo específico de remover BRAs e GRAs, estas demonstraram capacidade de remoção desses elementos. É importante evidenciar que o bom desempenho das ETEs na remoção de BRAs e GRAs depende, também, de fatores como a constância na manutenção, a operação adequada ou o treinamento adequado dos operadores, bem como o descarte regular de lodos e outros aspectos operacionais (PAZDA *et al.*, 2019; NNADOZIE *et al.*, 2017). Todavia, deve-se continuar investigando tais elementos, visto que são liberados para os corpos d'água e podem passar a característica de resistência e genes de resistência para as bactérias ambientais, aumentando a resistência no ambiente e, conseqüentemente, a chance dessas BRAs entrarem em contato com os humanos, seja através do consumo direto ou através de recreação e lazer.

Mesmo sendo observadas elevadas eficiências de remoção, ainda se observa uma alta carga de BRAs e GRAs sendo eliminados nos corpos hídricos, mostrando que as ETEs atuam como fontes importantes da disseminação dessa resistência.

#### 5.4.3 Abundância de elementos genéticos de resistência reportadas na literatura e no presente estudo

Como mencionado anteriormente, são variados os fatores que podem influenciar e impactar a diversidade microbiana nos esgotos brutos, sendo alguns extremamente importantes, como a demografia, a carga populacional, o clima ou a situação epidemiológica do local, mas as incertezas acerca da influência desses fatores nos elementos genéticos de resistência ainda são relatadas (VOOLAIID *et al.*, 2017). Nas próprias ETEs, as diferenças estruturais das ETEs, os tipos de tratamento, além de condições de operação e manutenção podem também influir na disseminação desses elementos (PAZDA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2021).

Nesta pesquisa, as concentrações absolutas médias de bactérias totais (determinada pela concentração do gene RNAr 16s) nas amostras de esgoto bruto variaram de  $10^7$  a  $10^9$  cópias/mL, levando em conta os valores mínimos e máximos reportados. Para o *integron* de classe 1 (*int1*), os valores mínimos foram aproximados a  $10^5$  cópias/mL, enquanto os valores máximos chegaram a  $10^8$  cópias/mL, também nas amostras afluentes às três ETEs. Ponderando-se a quantificação de todos os GRAs do estudo em amostras de esgoto bruto, o menor valor encontrado ficou na faixa de  $10^4$  a  $10^8$  cópias/mL. No efluente tratado, os valores de bactérias totais (RNAr 16S) estiveram entre  $10^8$  a  $10^9$  cópias/mL. Para o *integron* de classe 1 (*int1*), variou de  $10^5$  a  $10^7$  cópias/mL, e para os demais GRAs foi observado um intervalo de  $10^2$  a  $10^7$  cópias/mL. Algumas concentrações médias e valores aproximados dos elementos genéticos de resistência reportadas na literatura, tanto em esgoto bruto quanto em efluente tratado, são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações médias aproximadas de GRAs em EB e ET, reportados na literatura e no presente estudo

| Gene     | Esgoto Bruto<br>(nº de cópias/mL)       | Esgoto Tratado<br>(nº de cópias/mL)     | Efluente pós desinfecção<br>(nº de cópias/mL) | Remoção em log | Tipo de tratamento | Referência                         |
|----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------|--------------------|------------------------------------|
| 16S rRNA | $10^9$                                  | $10^7 - 10^8$                           | $10^7 - 10^8$                                 |                | LA+filtro+UV       | McConnell <i>et al.</i> , 2018     |
|          | $2,3 \times 10^8$                       | $3,7 \times 10^8$                       |                                               | -0,2           | LNA                | Rafraf <i>et al.</i> , 2016        |
|          | $5,8 \times 10^8$                       | $1,5 \times 10^8$                       |                                               | 0,6            | LAC                |                                    |
|          | $4,4 \times 10^8$                       | $2,2 \times 10^8$                       |                                               | 0,3            | LAC                |                                    |
|          | $4,6 \times 10^8$                       | $4,5 \times 10^5$                       |                                               | 3,0            | LA/RPN             | Makowska <i>et al.</i> , 2016      |
|          | $1 \times 10^9$                         | $3,6 \times 10^9$                       |                                               | -0,6           | LAC                |                                    |
|          | $9,8 \times 10^8$                       | $3,3 \times 10^8$                       |                                               | 0,5            | UASB+FBP           | Leroy-Freitas <i>et al.</i> , 2022 |
|          | $1,7 \times 10^9$                       | $1,1 \times 10^9$                       |                                               | 0,2            | LA-RBN+FQ          |                                    |
|          | $9,8 \times 10^8$                       | $3,3 \times 10^8$                       |                                               | 0,5            | WC                 |                                    |
|          | $9,8 \times 10^8$                       | $1,5 \times 10^8$                       |                                               | 0,8            | UASB+LAT           | SANTOS, 2021                       |
|          | $1,9 \times 10^9$                       | $1,6 \times 10^8$                       | $6,3 \times 10^7$                             | 1,1/0,4        | UASB+FBP +UV       |                                    |
|          | $1,1 \times 10^9 (\pm 4,8 \times 10^8)$ |                                         |                                               |                |                    |                                    |
|          | $8,3 \times 10^8 (\pm 6,5 \times 10^8)$ |                                         |                                               |                |                    | Presente estudo                    |
|          | $8,7 \times 10^8 (\pm 3,7 \times 10^8)$ | $7,2 \times 10^8 (\pm 4,8 \times 10^8)$ |                                               | 0,1            | LF+LM              |                                    |
| int1     | $10^5 - 10^6$                           | $10^4$                                  | $10^4 - 10^5$                                 |                | LA+filtro+UV       | McConnell <i>et al.</i> , 2018     |
|          | $*5,9 \times 10^{-2}$                   | $*1,3 \times 10^{-2}$                   |                                               |                | LNA                | Rafraf <i>et al.</i> , 2016        |
|          | $*2,9 \times 10^{-3}$                   | $*3,4 \times 10^{-2}$                   |                                               |                | LAC                |                                    |
|          | $*1,3 \times 10^{-2}$                   | $*1,4 \times 10^{-2}$                   |                                               |                | LAC                |                                    |
|          | $2,3 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^4$   | $2,1 \times 10^3 \pm 8,8 \times 10^2$   |                                               | 1,0            | LA/RPN             | Makowska <i>et al.</i> , 2016      |
|          | $8,9 \times 10^7$                       | $4,8 \times 10^7$                       |                                               | 0,3            | LAC                |                                    |
|          | $1,4 \times 10^8$                       | $3,6 \times 10^7$                       |                                               | 0,4            | UASB+FBP           | Leroy-Freitas <i>et al.</i> , 2022 |
|          | $2,2 \times 10^8$                       | $8,2 \times 10^7$                       |                                               | 0,3            | LA-RBN+FQ          |                                    |
|          | $3,4 \times 10^8$                       | $6,1 \times 10^7$                       |                                               | 0,7            | WC                 |                                    |
|          | $3,4 \times 10^8$                       | $1,0 \times 10^7$                       |                                               | 1,5            | UASB+LAT           | SANTOS, 2021                       |
|          | $3,1 \times 10^8$                       | $2,9 \times 10^7$                       | $7,0 \times 10^6$                             | 1,0/0,6        | UASB+FBP +UV       |                                    |
|          | $1,3 \times 10^8 (\pm 4,6 \times 10^7)$ |                                         |                                               |                |                    |                                    |
|          | $7,9 \times 10^7 (\pm 6,6 \times 10^7)$ |                                         |                                               |                |                    | Presente estudo                    |
|          | $9,8 \times 10^7 (\pm 3,6 \times 10^7)$ | $1,2 \times 10^7 (\pm 8,2 \times 10^6)$ |                                               | 0,9            | LF+LM              |                                    |
|          | $10^5$                                  | $10^3 - 10^4$                           | $10^3 - 10^4$                                 | 1 - 2,0        | LA+filtro+UV       | McConnell <i>et al.</i> , 2018     |



| Gene                 | Esgoto Bruto<br>(nº de cópias/mL)           | Esgoto Tratado<br>(nº de cópias/mL)         | Efluente pós desinfecção<br>(nº de cópias/mL) | Remoção em log | Tipo de tratamento | Referência                         |
|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------|--------------------|------------------------------------|
| <b><i>sul1</i></b>   | 10 <sup>9</sup>                             | 10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>           | 10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>             |                | LA+filtro+UV       | McConnell <i>et al.</i> , 2018     |
|                      | *7,6x10 <sup>-2</sup>                       | *6,0x10 <sup>-3</sup>                       |                                               |                | LNA                | Rafrat <i>et al.</i> , 2016        |
|                      | *3,6x10 <sup>-2</sup>                       | *3,7x10 <sup>-2</sup>                       |                                               |                | LAC                |                                    |
|                      | *2,0x10 <sup>-2</sup>                       | *1,4x10 <sup>-2</sup>                       |                                               |                | LAC                |                                    |
|                      | 7,6x10 <sup>4</sup> ±6,6x10 <sup>4</sup>    | 1,5x10 <sup>4</sup> ±1,2x10 <sup>4</sup>    |                                               | 0,7            | LA/RPN             | Makowska <i>et al.</i> , 2016      |
|                      | 3,48x10 <sup>8</sup>                        | 3,53x10 <sup>8</sup>                        |                                               | -0,01          | LAC                |                                    |
|                      | 4,5x10 <sup>8</sup>                         | 1,4x10 <sup>8</sup>                         |                                               | 0,5            | UASB+FBP           | Leroy-Freitas <i>et al.</i> , 2022 |
|                      | 6,7x10 <sup>8</sup>                         | 2,1x10 <sup>8</sup>                         |                                               | 0,5            | LA-RBN+FQ          |                                    |
|                      | 1,8x10 <sup>7</sup>                         | 2,8x10 <sup>7</sup>                         |                                               | -0,2           | WC                 |                                    |
|                      | 1,8x10 <sup>7</sup>                         | 2,3x10 <sup>7</sup>                         |                                               | -0,1           | UASB+LAT           | SANTOS, 2021                       |
|                      | 1,5x10 <sup>8</sup>                         | 3,4x10 <sup>7</sup>                         | 4,9x10 <sup>6</sup>                           | 0,6/0,8        | UASB+FBP +UV       |                                    |
|                      | 1,8x10 <sup>8</sup> (±4,3x10 <sup>7</sup> ) |                                             |                                               |                |                    |                                    |
|                      | 1,2x10 <sup>8</sup> (±7,9x10 <sup>7</sup> ) |                                             |                                               |                |                    |                                    |
|                      | 1,6x10 <sup>8</sup> (±4,7x10 <sup>7</sup> ) | 3,1x10 <sup>7</sup> (±1,6x10 <sup>7</sup> ) |                                               | 0,7            | LF+LM              | Presente estudo                    |
| <b><i>tetA</i></b>   | 1,6x10 <sup>3</sup> ±1,9x10 <sup>3</sup>    | 3,5x10 <sup>2</sup> ±3,1x10 <sup>2</sup>    |                                               | 0,7            | LA/RPN             | Makowska <i>et al.</i> , 2016      |
|                      | 3,2x10 <sup>6</sup>                         | 3,0x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 0,03           | LAC                |                                    |
|                      | 5,2x10 <sup>6</sup>                         | 1,7x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 0,5            | UASB+FBP           | Leroy-Freitas <i>et al.</i> , 2022 |
|                      | 3,5x10 <sup>6</sup>                         | 1,4x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 0,4            | LA-RBN+FQ          |                                    |
|                      | 1,2x10 <sup>6</sup>                         | 8,9x10 <sup>5</sup>                         |                                               | 0,1            | WC                 |                                    |
|                      | 1,2x10 <sup>6</sup>                         | 8,5x10 <sup>4</sup>                         |                                               | 1,1            | UASB+LAT           | SANTOS, 2021                       |
|                      | 2,5x10 <sup>6</sup>                         | 4,3x10 <sup>5</sup>                         | 1,1x10 <sup>6</sup>                           | 0,8/0,6        | UASB+FBP +UV       |                                    |
|                      | 1,5x10 <sup>6</sup> (±4,2x10 <sup>5</sup> ) |                                             |                                               |                |                    |                                    |
|                      | 9,8x10 <sup>5</sup> (±6,9x10 <sup>5</sup> ) |                                             |                                               |                |                    |                                    |
|                      | 2,5x10 <sup>6</sup> (±1,4x10 <sup>6</sup> ) | 5,9x10 <sup>3</sup> (±6,2x10 <sup>3</sup> ) |                                               | 2,6            | LF+LM              | Presente estudo                    |
| <b><i>blaTEM</i></b> | 10 <sup>4</sup>                             | 10 <sup>2</sup>                             | 10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>             | 2,0            | LA+filtro+UV       | McConnell <i>et al.</i> , 2018     |
|                      | *1,7x10 <sup>-3</sup>                       | *6,2x10 <sup>-4</sup>                       |                                               |                | LNA                | Rafrat <i>et al.</i> , 2016        |
|                      | *2,5x10 <sup>-4</sup>                       | *5,8x10 <sup>-3</sup>                       |                                               |                | LAC                |                                    |
|                      | *1,5x10 <sup>3</sup>                        | *2,4x10 <sup>-3</sup>                       |                                               |                | LAC                |                                    |
|                      | 3,6x10 <sup>7</sup>                         | 1,6x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 1,4            | LAC                |                                    |
|                      | 3,5x10 <sup>7</sup>                         | 2,3x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 1,2            | UASB+FBP           | Leroy-Freitas <i>et al.</i> , 2022 |
|                      | 6,8x10 <sup>7</sup>                         | 2,3x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 1,5            | LA-RBN+FQ          |                                    |
|                      | 5,2x10 <sup>7</sup>                         | 5,7x10 <sup>6</sup>                         |                                               | 1,0            | WC                 | SANTOS, 2021                       |

| Gene        | Esgoto Bruto<br>(nº de cópias/mL)               | Esgoto Tratado<br>(nº de cópias/mL)             | Efluente pós desinfecção<br>(nº de cópias/mL) | Remoção em log | Tipo de tratamento  | Referência                    |
|-------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------|
|             | <b>10<sup>9</sup></b>                           | <b>10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup></b>          | <b>10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup></b>        |                | <b>LA+filtro+UV</b> | <b>McConnell et al., 2018</b> |
|             | 5,2x10 <sup>7</sup>                             | 1,8x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 3,5            | UASB+LAT            |                               |
|             | 5,1x10 <sup>7</sup>                             | 5,1x10 <sup>5</sup>                             | 1,6x10 <sup>5</sup>                           | 2,0/0,5        | UASB+FBP +UV        |                               |
|             | <b>4,3x10<sup>7</sup> (±1,3x10<sup>7</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     | <b>Presente estudo</b>        |
|             | <b>3,5x10<sup>7</sup> (±2,2x10<sup>7</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     |                               |
|             | <b>7,0x10<sup>7</sup> (±3,9x10<sup>7</sup>)</b> | <b>6,7x10<sup>4</sup> (±6,5x10<sup>4</sup>)</b> |                                               | <b>3,1</b>     | <b>LF+LM</b>        |                               |
| <i>ermB</i> | <b>10<sup>5</sup></b>                           | <b>10<sup>3</sup></b>                           | <b>10<sup>3</sup></b>                         | <b>2,0</b>     | <b>LA+filtro+UV</b> | <b>McConnell et al., 2018</b> |
|             | <b>*7,6x10<sup>-4</sup></b>                     | <b>*2,0x10<sup>-3</sup></b>                     |                                               |                | <b>LNA</b>          | <b>Raíra et al., 2016</b>     |
|             | <b>*6,6x10<sup>-3</sup></b>                     | <b>*1,2x10<sup>-3</sup></b>                     |                                               |                | <b>LAC</b>          |                               |
|             | <b>*5,6x10<sup>-2</sup></b>                     | <b>*1,7x10<sup>-3</sup></b>                     |                                               |                | <b>LAC</b>          |                               |
|             | 1,8x10 <sup>5</sup>                             | 3,1x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 0,8            | LAC                 | Leroy-Freitas et al., 2022    |
|             | 1,8x10 <sup>5</sup>                             | 1,4x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 1,1            | UASB+FBP            |                               |
|             | 3,3x10 <sup>5</sup>                             | 1,9x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 1,2            | LA-RBN+FQ           |                               |
|             | <b>1,1x10<sup>7</sup> (±5,1x10<sup>6</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     | <b>Presente estudo</b>        |
|             | <b>4,7x10<sup>6</sup> (±2,9x10<sup>6</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     |                               |
|             | <b>6,1x10<sup>7</sup> (±2,2x10<sup>7</sup>)</b> | <b>9,8x10<sup>4</sup> (±1,0x10<sup>5</sup>)</b> |                                               | <b>3,1</b>     | <b>LF+LM</b>        |                               |
| <i>qnrB</i> | 1,1x10 <sup>5</sup>                             | 2,4x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 0,7            | LAC                 | Leroy-Freitas et al., 2022    |
|             | 1,9x10 <sup>5</sup>                             | 2,9x10 <sup>4</sup>                             |                                               | 0,8            | UASB+FBP            |                               |
|             | 3,1x10 <sup>4</sup>                             | 6,4x10 <sup>3</sup>                             |                                               | 0,7            | LA-RBN+FQ           |                               |
|             | <b>1,1x10<sup>6</sup> (±4,9x10<sup>5</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     | <b>Presente estudo</b>        |
|             | <b>4,8x10<sup>5</sup> (±3,5x10<sup>5</sup>)</b> |                                                 |                                               |                |                     |                               |
|             | <b>2,1x10<sup>6</sup> (±1,5x10<sup>6</sup>)</b> | <b>3,9x10<sup>3</sup> (±7,4x10<sup>3</sup>)</b> |                                               | <b>3,1</b>     | <b>LF+LM</b>        |                               |

LNA: Lagoas Naturalmente Aeradas; FBP: Filtro Biológico Percolador; FQ: Tratamento Físico-Químico; LAC: Lodos Ativados Convencional; LAT: Lagoas de Alta Taxa; LF + LM: Lagoa Facultativa e Lagoa de Maturação; UASB: Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente; RBN: Remoção Biológica de Nutrientes; WC: *Wetlands* Construída.  
 Resultados do presente estudo em negrito. \* Resultados de concentração relativa

A pesquisa acerca da quantificação desses elementos em outros estudos é de extrema valia, visto que auxilia no aprimoramento do entendimento sobre o efeito dos diferentes tipos de tratamento empregados, além de determinadas características geográficas, que, conforme mencionado, influenciam nas características sobre o resistoma de águas residuárias.

As abundâncias médias reportadas por Makowska *et al.* (2016) dos genes *int1*, *sul1* e *tetA* foram consideravelmente menores que aquelas determinadas nesta pesquisa, observando-se uma diferença de 3,7, 3,3 e 3,0 log. Para o gene RNAr 16S, os valores foram próximos, sendo notado abundância ligeiramente maior (0,3 log) neste estudo. Este gene foi utilizado (assim como em todos os outros trabalhos) para se estimar a abundância bacteriana total e normalização dos dados, assim como para calcular a abundância relativa dos GRAs, pois está presente em todas as bactérias e serve como um gene marcador.

Quando se compara as abundâncias dos genes *int1*, *sul1*, *blaTEM* e *ermB* determinadas no presente trabalho com as reportadas por McConnell *et al.* (2018) (em esgoto bruto de ETE no Canadá), verifica-se que os valores reportados por eles foram cerca de 2 a 3 unidades log menores que os determinados na presente pesquisa; o que pode indicar diferenças no perfil de resistência aos antibióticos, em função das localidades, consumo de antibióticos, entre a América do Norte e América do Sul (fato também reportado por Hendrikssen *et al.*, 2019).

Percebendo-se os valores encontrados por Leroy-Freitas *et al.* (2022) e SANTOS (2021), que estudaram estes elementos também em esgotos da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, para o gene RNAr 16S foram observados, também, valores extremamente próximos, sendo somente cerca de 0,1 e 0,2 log maiores que as concentrações encontradas neste trabalho, respectivamente, considerando-se as médias dos três pontos para as análises. Em relação ao gene *int1*, as abundâncias médias absolutas encontradas neste estudo foram cerca de 0,2 log menores que os valores trazidos por Leroy-Freitas *et al.* (2022), e 0,5 log menores quando comparados com SANTOS (2021). Para o gene *sul1* e *tetA*, Leroy-Freitas *et al.* (2020) observou valores médios maiores (0,5 e 0,4 log) que os valores médios reportados neste estudo. SANTOS (2021), por sua vez, observou valores médios menores em 0,4 log, para

*sul1*, ao se comparar com este estudo. As diferenças para o gene *bla*TEM, considerando-se os valores médios, também foram mínimas para ambos os trabalhos. Ou seja, os valores foram próximos para os mesmos GRAs determinados.

Como se observou, as concentrações médias não se mostram com diferenças tão discrepantes entre si, de um período para o outro, a não ser para os genes de resistência aos grupos de antibióticos macrolídeos (*ermB*) e quinolonas (*qnrB*), que foram maiores que os valores encontrados por Leroy-Freitas *et al.* (2022), equivalendo a aproximadamente 2,0 e 1,0 log para cada gene, respectivamente.

Ao se comparar a abundância média absoluta do gene RNAr 16S, com os valores encontrados por Raíraf *et al.* (2016), cuja pesquisa se deu na Tunísia, os autores reportaram valores médios cerca de 0,4 log menores que aqueles reportados neste estudo, ou seja, os valores encontrados não foram discrepantes entre si. A abundância média encontrada no efluente tratado por lagoas, deste estudo, também não foram tão distintas em relação às encontradas pelos autores, sendo 0,5 log maiores. Já em relação às abundâncias relativas médias, neste estudo pôde-se observar abundâncias maiores que aquelas relatadas pelos autores, para todos os genes comparados (*int1*, *sul1*, *bla*TEM e *ermB*), mas especialmente para *int1* e *sul1* essa diferença foi maior ( $1,35 \times 10^{-1}$  e  $2,21 \times 10^{-1}$  nº de cópias GRAs/RNAr 16S, respectivamente, enquanto os autores encontraram  $2,48 \times 10^{-2}$  e  $4,38 \times 10^{-2}$  nº de cópias GRAs/RNAr 16S).

As abundâncias relativas encontradas neste estudo para o efluente tratado foram consideravelmente menores, em alguns casos similares (como, por exemplo, para o gene *ermB*) que aquelas reportadas por Raíraf *et al.* (2016). Conforme exposto pelos autores, a abundância relativa de *ermB* reduziu significativamente para as ETEs, exceto para a ETE constituída de lagoas naturalmente aeradas. Já as abundâncias relativas de *int1* e *sul1* não apresentaram diferença entre si, em relação aos afluentes e efluentes, exceto para a mesma ETE, na qual o sistema de tratamento de lagoa naturalmente aerada reduziu significativamente ambos os genes. O gene *bla*TEM teve maior concentração no afluente da ETE 2, com sistema de tratamento de lodos ativados convencional, sendo um afluente que recebe, além de esgoto doméstico e industrial, descarte hospitalar sem tratamento. Neste estudo, houve redução na

abundância relativa de todos os genes mencionados e as concentrações reportadas foram menores ao se comparar com aquelas mostradas pelos autores. Isso mostra que o sistema de tratamento LF+LM foi eficiente e conseguiu remover uma parcela de genes de resistência, que não aumentaram sua prevalência durante o processo de tratamento e no efluente final.

Munk *et al.* (2022) encontraram 557 GRAs diferentes em amostras coletadas de 101 países, alguns deles foram universais e encontrados em todas as amostras, sendo *mphE*, *msrE*, *tetA*, *tetC*, *tetW*, *sul1* e *sul2*. Os autores observaram que vários gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, foram hospedeiros de muitos GRAs diferentes, alguns sendo compartilhados com outras Proteobacterias, enquanto outras foram vistas exclusivamente em seus respectivos gêneros. A importância de *E. coli* como um facilitador para o aumento da transmissão de GRA também foi observada, assim como a ideia de que a maior probabilidade de ocorrência de transferência horizontal de genes entre bactérias filogeneticamente relacionadas.

É evidenciado a importância dos plasmídeos na transmissão global da RAM e, além disso, na importância da assinatura geográfica e fatores como: clima local, condições ambientais, material de superfície amostrado, além da geografia e as diferenças nos ambientes naturais ou construídos pelos quais o esgoto flui, poluentes químicos, entre outros. São características que influenciarão no microbioma final. No presente trabalho, *E. coli* foi detectada em várias amostras de esgoto afluente e efluente, sendo resistente a vários antibióticos testados (conforme mostrado na Tabela 8), corroborando assim os achados reportados por Munk *et al.* (2022).

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Foram observadas concentrações similares entre os esgotos brutos das três ETEs, na região de Belo Horizonte/MG, em relação à BHTs e BRAs, exceto para bactérias resistentes à amoxicilina e meropenem, que apresentaram diferença significativa entre suas concentrações (para um nível de significância igual a 5% -  $\alpha = 0,05$ ). Neste caso, as diferenças significativas se deram somente para as BRAs mencionadas, entre as ETEs 1 e 3 e entre os três pontos, respectivamente, embora as ETEs 1 e 2 tratem esgotos com características, em sua maior parte, domésticas e a ETE 3 trate esgoto de um aeroporto internacional.
- Para os genes investigados, foram observadas diferenças significativas para 6 dos 7 estudados (*int1*, *sul1*, *tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*), para um nível de significância igual a 5% ( $\alpha = 0,05$ ), ou seja, somente para o gene RNAr 16S obteve-se uma abundância semelhante entre as três ETEs. Conforme comentado, as ETEs possuem contribuições diferentes, com populações distintas (inclusive quanto a aspectos socioeconômicos) e bacias de esgotamento sanitário diferentes, que influenciaram nas concentrações observadas e reportadas neste estudo. Inclusive, para alguns GRAs (*tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB*), as maiores abundâncias absolutas reportadas em esgoto bruto foram de amostras provenientes da ETE 3.
- O sistema de tratamento de lagoas facultativas, seguido por lagoa de maturação, mostrou-se eficiente para a remoção de BHTs, BRAs e GRAs que foram investigados. Para BRAs, verificou-se uma remoção média de 1,2 a 2,6 unidades log, enquanto para GRAs foram reportados valores médios de remoção de 0,7 até 3,1 unidades log, especialmente quando comparado com outros tipos de sistemas trazidos neste estudo, tanto no Brasil quanto em outros países do mundo. Isso mostra que este sistema foi eficiente na redução da disseminação da RAM no ambiente, apesar de o efluente tratado ainda conter cerca de  $10^3$  cópias/mL de GRAs.
- Dentre as bactérias resistentes identificadas com fenótipo de multirresistência (MDR), tanto no esgoto bruto quanto no efluente tratado, ao menos 4 foram de

bactérias pertencentes ao grupo ESKAPE (lista dos seis patógenos prioritários definidos pela OMS), como a espécie *Klebsiella pneumoniae*, e gêneros *Staphylococcus*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*; por sua vez, no efluente tratado foram dois gêneros desta lista com fenótipo MDR (as espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter asburiae*).

- Ao se comparar os valores reportados neste estudo, com valores encontrados por autores que investigaram o esgoto bruto da região metropolitana de Belo Horizonte/MG antes da pandemia, verificou-se aumento na concentração de BHTs (0,9 a 1,2 unidades log), algumas BRAs (resistentes a amoxicilina e sulfametoxazol e trimetoprim, sendo cerca de 1,0 e 0,7 log maiores), além de GRAs (*ermB* e *qnrB*, sendo cerca de 2,0 e 1,0 log maiores). Isso sugere o impacto da pandemia no aumento da circulação e disseminação de BRAs e GRAs no esgoto bruto.

## REFERÊNCIAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde, Brasília, 2017.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS. **Ministério da Saúde**, 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>>. Acesso em: 1 de jan 2022.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Curso, Módulo 1: Antimicrobianos – Bases teóricas e Uso Clínico. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2007. Disponível em: <[https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>. Acesso em: 2 de fev 2023.

APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: APHA, 2019.

ASFAW, Tsegahun et al. Antibiotic resistant bacteria from treated and untreated hospital wastewater at Ayder Referral Hospital, Mekelle, North Ethiopia. **Advances in Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 871-886, 2017.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes et al. Mecanismos de resistência aos antibióticos. 2013. Dissertação de Mestrado.

BEN, Weiwei et al. Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. **Chemosphere**, v. 172, p. 392-398, 2017.

BINH, Vu Ngan et al. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: sources, concentrations, risk and control strategy. **Chemosphere**, v. 197, p. 438-450, 2018.

BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Painel Nacional de Saneamento - **SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento**. Disponível em:



<<https://www.gov.br/mdr/pt-br/assuntos/saneamento/snis/painel/es>>. Acesso em: 15 de jun de 2023.

CASTRO-LOPES, Alexandre et al. Increase of antimicrobial consumption in a tertiary care hospital during the first phase of the COVID-19 pandemic. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 778, 2021.

CHEN, Yao-Yao et al. Aqueous tetracycline degradation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone: removal and transformation pathway. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 15-23, 2017.

CHU, B. T. T.; PETROVICH, M. L.; CHAUDHARY, A.; WRIGHT, D.; MURPHY, B.; WELLS, G.; PORETSKY, R. Metagenomics Reveals the Impact of Wastewater Treatment Plants on the Dispersal of Microorganisms and Genes in Aquatic Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 5, 2017.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DEL FIOLE, Fernando de Sá et al. Consumption trends of antibiotics in Brazil during the COVID-19 pandemic. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 844818, 2022.

DEL FIOLE, F.S.; MATTOS FILHO, T.R.; GROppo, F.C. Resistência bacteriana. **Rev Bras Med.**; 57(10): 85-7, 2000.

European Commission - Environment. **Urban Wastewater Treatment**. Disponível em: <[https://environment.ec.europa.eu/topics/water/urban-wastewater\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/water/urban-wastewater_en)>. Acesso em: 05 de jul de 2023.

FERREIRA DA SILVA, M.; TIAGO, I.; VERISSIMO, A.; BOAVENTURA, R.A.R.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban waste water treatment plant. **FEMS Microbiol Ecol**. V. 55, p.322–329, 2006.

FLUIT, Ad C.; VISSER, Maarten R.; SCHMITZ, Franz-Josef. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FREITAS, D. L. Elementos genéticos de resistência a antibióticos, composição microbiana total e de potenciais patógenos em diferentes Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários. Belo Horizonte, 2020, 99 p. Dissertação (Mestrado). **Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2020.

GATICA, J.; KAPLAN, E.; CYTRYN, E. Antibiotic resistance elements in wastewater treatment plants: scope and potential impacts. **Wastewater Reuse and Current Challenges**, v. 44, p. 129-153, 2015.

GHAZY, Ramy Mohamed et al. A systematic review and meta-analysis on chloroquine and hydroxychloroquine as monotherapy or combined with azithromycin in COVID-19 treatment. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

GILLINGS, Michael R. Class 1 integrons as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10-15, 2017.

GILLINGS, M. R.; GAZE, W. H.; PRUDEN, A.; SMALLA, K.; TIEDJE, J. M.; ZHU, Y. G. Using the class 1 integrin-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **ISME J**, v. 9, p. 1269-1279, 2015.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present and future. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 78, p. 257-277, 2014.

GRAU, Santiago et al. Antimicrobial consumption among 66 acute care hospitals in Catalonia: impact of the COVID-19 pandemic. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 943, 2021.

GRAU, Santiago et al. Evolution of antimicrobial consumption during the first wave of COVID-19 pandemic. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 132, 2021.

GUO, Jianhua et al. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. **Water research**, v. 123, p. 468-478, 2017.

HALL, RUTH M. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. In: **Ciba Foundation Symposium 207-Antibiotic**

**Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread: Antibiotic Resistance: Chichester**, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2007. p. 192-205.

HENDRIKSEN, Rene S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1124, 2019.

HONDA, Ryo et al. Estimated discharge of antibiotic-resistant bacteria from combined sewer overflows of urban sewage system. **NPJ Clean Water**, v. 3, n. 1, p. 15, 2020.

IAKOVIDES, I. C. et al. Reduction of antibiotic resistance determinants in urban wastewater by ozone: Emphasis on the impact of wastewater matrix towards the inactivation kinetics, toxicity and bacterial regrowth. **Journal of Hazardous Materials**, v. 420, p. 126527, 2021.

KADHUM, Hussein A.; HASAN, Thualfakar H. The study of bacillus subtilis antimicrobial activity on some of the pathological isolates. **International Journal of Drug Delivery Technology**, v. 9, n. 2, p. 193-196, 2019.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009.

LASKEN, Roger S.; MCLEAN, Jeffrey S. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 9, p. 577-584, 2014.

LE, Thai-Hoang et al. Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. **Water research**, v. 145, p. 498-508, 2018.

LEROY-FREITAS, D. et al. Exploring the microbiome, antibiotic resistance genes, mobile genetic element, and potential resistant pathogens in municipal wastewater

treatment plants in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 842, p. 156773, 2022.

LI, S. et al. Technologies towards antibiotic resistance genes (ARGs) removal from aquatic environment: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, p. 125148, 2021.

MACHADO, Elayne Cristina et al. Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159376, 2023.

MACHADO, E. C. et al. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, p. 847-857, 2020.

MACHADO, E. C. Ocorrência, prevalência e remoção de bactérias resistentes a antibióticos em diferentes tipologias de sistemas compactos de tratamento de esgoto sanitário. Belo Horizonte, 2019, 44 p. Tese (Doutorado). **Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2019.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock-14<sup>a</sup> Edição. **Artmed Editora**, 2016.

MAKOWSKA, Nicoletta; KOCZURA, Ryszard; MOKRACKA, Joanna. Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. **Chemosphere**, v. 144, p. 1665-1673, 2016.

MANAIA, C. M.; MACEDO, G.; FATTA-KASSINOS, D.; NUNES, O. C. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1543-1557, 2016.

MANAIA, Célia M. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 3, p. 173-181, 2017.

MANAIA, C. M.; ROCHA, J.; SCACCIA, N.; MARANO, R.; RADU, E.; BIANCULLO, F.; CERQUEIRA, F.; FORTUNATO, G.; IAKOVIDES, I. C.; ZAMMIT, I.; KAMPOURIS, I.;

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. **Environment International**, v. 115, p. 312-324, 2018.

MCCONNELL, Mandy M. et al. Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 643, p. 292-300, 2018.

MELO, José Romério Rabelo et al. Automedicação e uso indiscriminado de medicamentos durante a pandemia da COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, 2021.

MENEZES, M. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. **Portal Fiocruz**, 2021. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>>. Acesso em: 2 de jan 2022.

MILLION, Matthieu et al. Effect of hydroxychloroquine and azithromycin on SARS-CoV-2 clearance in COVID-19 patients, a meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 1, p. 106240, 2021.

Ministério da Saúde - Brasil. **COVID-19: Painei Coronavírus**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 20 de jun de 2023.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MUNK, Patrick et al. Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7251, 2022.

NNADOZIE, C. F.; KUMARI, S.; BUX, F. Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 3, p. 491-515, 2017.

NOVO, Ana; MANAIA, Célia M. Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1157-1166, 2010.

OMS (Organização Mundial das Nações Unidas). Documento de Informação Técnica Sobre Água, Saneamento, Higiene e Gestão das Águas Residuais para Prevenir Infecções e Reduzir a Propagação da Resistência aos Antimicrobianos. 2020.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **COVID-19: Histórico da Pandemia**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso em: 01 de jun de 2023.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). Resistência Antimicrobiana. **OPAS**, 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>>. Acesso em: 3 de jan 2022.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). Américas notificam aumento de infecções resistentes a medicamentos devido ao uso indevido de antimicrobianos durante pandemia. **OPAS**, 2021. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/17-11-2021-americas-notificam-aumento-infeccoes-resistentes-medicamentos-devido-ao-uso>>. Acesso em: 3 de jan 2022.

PASSOS, R. G. Avaliação de desempenho de lagoas de estabilização por meio de dados de monitoramento e modelagem em fluidodinâmica computacional (CFD). Belo Horizonte, 2012, 278 p. Dissertação (Mestrado). **Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2012.

PÉREZ, C. Resistencia Bacteriana. **SusMedicos**, Colombia, 20 de mai. de 2007. Disponível em: <[https://www.susmedicos.com/art\\_Resistencia\\_Bacteriana.htm](https://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm)>. Acesso em: 25 jan. 2023.

Prefeitura de Belo Horizonte. Secretaria Municipal de Saúde. **Coronavírus - Boletim**. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/coronavirus>>. Acesso em: 20 de jun de 2023.

RAFRAF, Ikbel Denden et al. Abundance of antibiotic resistance genes in five municipal wastewater treatment plants in the Monastir **Governorate, Tunisia. Environmental pollution**, v. 219, p. 353-358, 2016.

REINTHALER, F.F., POSCH, J., FEIERL, G., WÜST, G., HAAS, D., RUCKENBAUER, G., MASCHER, F., MARTH, E.. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. **Water Res.** 37, 1685–1690, 2003.

RICE, Louis B.; BONOMO, Robert A. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Antibiotics in laboratory medicine**, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md, p. 453-501, 1996.

RIZZO, L. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the total environment**, v. 447, p. 345-360, 2013.

ROCHA, L. Entenda o que são superbactérias e a ameaça global da resistência a antibióticos. **CNN Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/entenda-o-que-sao-superbacterias-e-por-que-elas-ameacam-a-saude-publica-global/>>. Acesso em: 1 de jan 2022.

SANTOS, L. S. Ocorrência e remoção de genes de resistência a antibióticos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto, em Belo Horizonte/MG. Belo Horizonte, 2021, 83 p. Dissertação (Mestrado). **Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2021.

Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Boletim Epidemiológico COVID-19** - Ano 2022. Disponível em: <<https://coronavirus.saude.mg.gov.br/boletim2022>>. Acesso em: 20 de jun de 2023.

STEWART, Eric J. Growing unculturable bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151-4160, 2012.

STOKES, Hatch W.; GILLINGS, Michael R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 5, p. 790-819, 2011.

SULIS, Giorgia et al. Sales of antibiotics and hydroxychloroquine in India during the COVID-19 epidemic: An interrupted time series analysis. **PLoS Medicine**, v. 18, n. 7, p. e1003682, 2021.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2005.

VAN HOEK, A. H.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológicos de Águas Residuárias. Vol. 1: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4 ed. Belo Horizonte: **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG**, 2014. 452 p.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Vol. 2: Princípios básicos do tratamento de esgotos. 2 ed. Belo Horizonte: **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG**, 2016. 211 p.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Vol. 3: Lagoas de estabilização. 2 ed. Belo Horizonte: **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG**, 2002. 196 p.

VOOLAID, Veiko et al. Bacterial diversity and antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influents and effluents. **Antimicrobial resistance in wastewater treatment processes**, p. 157-178, 2017.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Antimicrobial resistance. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 11 de dez 2022.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2, 2014.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **COVID-19 Dashboard**. WHO, 2023. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 20 de jun de 2023.



WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. 2022.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2019.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.

XU, Yan et al. Occurrence and distribution of antibiotics, antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing, China. **Environmental pollution**, v. 213, p. 833-840, 2016.

YIN, X. et al. Evaluation of early antibiotic use in patients with non-severe COVID-19 without bacterial infection. **International journal of antimicrobial agents**, v. 59, n. 1, p. 106462, 2022.

ZHANG, Tong; ZHANG, Xu-Xiang; YE, Lin. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. **PloS one**, v. 6, n. 10, 2011.

ZHOU, Zhen-Chao et al. Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments. **Environment international**, v. 121, p. 1155-1161, 2018.

## APÊNDICE A – Resultados obtidos da quantificação de BHTs e BRAs

**Tabela A1 – Resultados obtidos da quantificação de BHTs e BRAs nas amostras de EB e ET das ETEs estudadas, em UFC/mL**

| Data            | BHTs     | BRAMO    | BRAZT<br>(UFC/mL) | BRCFX    | BRMRP    | BRTRIAZOL |
|-----------------|----------|----------|-------------------|----------|----------|-----------|
| <b>EB ETE 1</b> |          |          |                   |          |          |           |
| 27/10/2021      | 3,44E+06 | 9,30E+05 | 4,55E+05          | 2,66E+06 | 7,40E+04 | 3,40E+04  |
| 10/11/2021      | 7,40E+06 | 4,00E+05 | 4,00E+05          | 2,00E+06 | 4,00E+05 | 1,30E+05  |
| 17/11/2021      | 6,13E+06 | 1,59E+06 | 7,30E+05          | 5,96E+05 | 5,40E+04 | 2,10E+04  |
| 24/11/2021      | 4,25E+06 | 7,50E+05 | 7,30E+05          | 7,27E+05 | 1,49E+05 | 5,20E+04  |
| 01/12/2021      | 4,45E+06 | 2,00E+05 | 1,29E+06          | 7,80E+05 | 1,44E+05 | 2,33E+04  |
| 09/12/2021      | 5,03E+06 | 6,20E+05 | 1,11E+06          | 1,16E+06 | 2,73E+05 | 8,54E+05  |
| 16/12/2021      | 1,72E+06 | 5,10E+05 | 4,93E+05          | 2,84E+05 | 2,90E+04 | 3,00E+04  |
| 23/12/2021      | 2,15E+06 | 5,00E+04 | 1,98E+05          | 4,45E+05 | 7,75E+04 | 6,75E+04  |
| 31/12/2021      | 1,63E+06 | -        | 6,88E+05          | 1,83E+05 | 7,25E+04 | 8,25E+04  |
| 07/01/2022      | 3,18E+06 | 9,10E+05 | 8,40E+05          | 4,40E+06 | 1,08E+05 | 7,50E+04  |
| 14/01/2022      | 3,33E+06 | 6,00E+05 | 1,35E+06          | 7,50E+04 | 8,50E+05 | 6,25E+04  |
| 21/01/2022      | 7,30E+05 | 1,20E+05 | 2,18E+05          | 4,07E+05 | 6,70E+04 | 1,10E+04  |
| 28/01/2022      | 2,70E+06 | 1,50E+05 | 7,50E+05          | 2,33E+05 | 1,13E+05 | 4,25E+04  |
| 10/02/2022      | 2,78E+06 | 4,75E+05 | 7,00E+05          | 5,50E+04 | 4,50E+04 | 6,75E+04  |
| 11/03/2022      | 1,40E+06 | 9,90E+05 | 1,18E+06          | 1,20E+04 | 2,10E+04 | 7,10E+04  |
| 18/03/2022      | 1,85E+06 | 7,50E+05 | 7,00E+05          | 6,50E+04 | 1,45E+05 | 1,55E+05  |
| 23/03/2022      | 2,08E+06 | 7,75E+05 | 5,75E+05          | 4,25E+05 | 4,00E+04 | 9,00E+04  |
| 30/03/2022      | 2,45E+06 | 6,50E+05 | 1,58E+06          | 4,33E+05 | 7,25E+04 | 1,73E+05  |
| 06/04/2022      | 2,68E+06 | 1,30E+06 | 2,35E+06          | 4,15E+05 | 3,50E+04 | 3,25E+04  |
| 13/04/2022      | 1,00E+08 | 3,66E+07 | 1,48E+07          | 6,64E+06 | 3,31E+05 | 1,04E+05  |
| 20/04/2022      | 2,00E+06 | 1,50E+06 | 1,10E+06          | 7,70E+05 | 3,40E+04 | 4,70E+04  |
| 27/04/2022      | 3,04E+06 | 9,80E+05 | 3,20E+06          | 5,80E+05 | 5,00E+04 | 5,80E+04  |
| 04/05/2022      | 2,33E+06 | 1,50E+06 | 1,33E+06          | 2,75E+05 | 1,05E+05 | 9,50E+04  |
| 11/05/2022      | 3,07E+06 | 2,75E+06 | 1,76E+06          | 1,09E+06 | 6,00E+04 | 6,30E+04  |
| 18/05/2022      | 8,92E+06 | 1,60E+06 | 2,25E+06          | 1,44E+06 | 1,21E+05 | 6,70E+04  |
| 29/05/2022      | 3,97E+06 | 4,20E+05 | 2,73E+06          | 5,90E+05 | 1,57E+05 | 1,10E+05  |
| 03/06/2022      | 5,58E+06 | 5,50E+05 | 2,43E+06          | 1,58E+06 | 1,65E+05 | 7,00E+04  |
| <b>EB ETE 2</b> |          |          |                   |          |          |           |
| 27/10/2021      | 3,37E+06 | 1,90E+05 | 1,20E+06          | 1,34E+06 | 2,50E+04 | 3,80E+04  |
| 10/11/2021      | 2,60E+06 | 2,00E+05 | 1,08E+06          | 3,10E+06 | 1,66E+05 | 5,80E+04  |
| 17/11/2021      | 6,18E+06 | 3,90E+05 | 1,48E+06          | 6,30E+05 | 5,71E+04 | 4,50E+04  |
| 24/11/2021      | 4,56E+06 | 8,00E+05 | 1,01E+06          | 5,28E+05 | 2,90E+04 | 1,80E+04  |
| 01/12/2021      | 4,59E+06 | 2,20E+05 | 2,05E+06          | 7,10E+04 | 6,64E+04 | 3,61E+04  |
| 09/12/2021      | 7,50E+06 | 1,57E+06 | 2,06E+06          | 1,33E+06 | 2,20E+05 | 7,07E+04  |
| 16/12/2021      | 2,17E+06 | 1,60E+05 | 3,81E+05          | 3,66E+05 | 1,50E+04 | 4,80E+04  |
| 23/12/2021      | 2,18E+06 | 2,50E+04 | 3,03E+05          | 2,48E+05 | 7,50E+03 | 7,75E+04  |
| 31/12/2021      | 2,90E+06 | 2,50E+04 | 4,55E+05          | 3,58E+05 | 5,50E+04 | 1,00E+05  |
| 07/01/2022      | 4,01E+06 | 9,90E+05 | 9,30E+05          | 6,01E+05 | 6,91E+04 | 4,86E+04  |
| 21/01/2022      | 9,50E+05 | 5,00E+04 | 4,10E+05          | 2,75E+05 | 3,30E+04 | 3,10E+04  |
| 28/01/2022      | -        | 3,75E+05 | 5,58E+05          | 5,33E+05 | 1,50E+04 | 1,18E+05  |
| 10/02/2022      | 1,58E+06 | 3,25E+05 | 5,00E+05          | 1,25E+04 | 7,50E+03 | 2,00E+04  |
| 11/03/2022      | 1,94E+06 | 8,00E+04 | 7,54E+05          | 1,20E+04 | 9,00E+03 | 2,70E+04  |
| 18/03/2022      | 3,25E+06 | 8,75E+05 | 7,75E+05          | 1,00E+04 | 2,85E+05 | 7,00E+04  |
| 23/03/2022      | 6,40E+06 | 1,88E+06 | 7,50E+05          | 7,50E+03 | 5,00E+03 | 2,50E+04  |
| 30/03/2022      | 2,55E+06 | 5,25E+05 | 5,75E+05          | 3,63E+05 | 2,25E+04 | 1,75E+04  |
| 06/04/2022      | 3,75E+06 | 1,00E+06 | 1,00E+06          | 3,28E+05 | 2,25E+04 | 7,25E+04  |
| 13/04/2022      | 1,34E+07 | 1,41E+07 | 1,30E+07          | 4,60E+05 | 1,73E+05 | 5,50E+04  |

| Data                   | BHTs     | BRAMO    | BRAZT    | BRCFX    | BRMRP    | BRTRIAZOL |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| (UFC/mL)               |          |          |          |          |          |           |
| EB ETE 2 (continuação) |          |          |          |          |          |           |
| 20/04/2022             | 2,80E+06 | 1,60E+06 | 3,00E+06 | 3,90E+05 | 6,50E+04 | 4,10E+04  |
| 27/04/2022             | 3,01E+06 | 1,68E+06 | 6,01E+06 | 8,30E+05 | 2,70E+04 | 1,33E+05  |
| 04/05/2022             | 2,80E+06 | 5,75E+05 | 1,43E+06 | 1,03E+06 | 1,25E+04 | 1,05E+05  |
| 11/05/2022             | 3,94E+06 | 4,90E+05 | 1,81E+06 | 1,18E+06 | 3,00E+04 | 6,20E+04  |
| 18/05/2022             | 3,00E+06 | 7,70E+05 | 1,63E+06 | 9,70E+05 | 1,16E+05 | 5,10E+04  |
| 29/05/2022             | 4,64E+06 | 8,50E+05 | 2,18E+06 | 1,27E+06 | 8,30E+04 | 1,90E+04  |
| 03/06/2022             | 2,53E+06 | 8,00E+05 | 1,35E+06 | 6,50E+05 | 2,23E+05 | 5,00E+04  |
| EB ETE 3               |          |          |          |          |          |           |
| 27/10/2021             | 1,95E+06 | 3,00E+04 | 3,30E+05 | 1,80E+05 | 1,61E+04 | 1,67E+04  |
| 04/11/2021             | 4,33E+05 | 3,50E+05 | 1,75E+06 | 3,10E+05 | 2,80E+04 | 4,80E+05  |
| 10/11/2021             | 8,40E+06 | 2,00E+05 | 4,00E+05 | 2,74E+06 | 1,96E+05 | 7,00E+04  |
| 17/11/2021             | 9,30E+06 | 3,34E+05 | 1,72E+07 | 4,40E+05 | 5,28E+04 | 5,13E+04  |
| 01/12/2021             | 2,57E+06 | 8,30E+04 | 7,10E+05 | 1,32E+05 | 1,35E+04 | 2,23E+04  |
| 09/12/2021             | 4,46E+06 | 1,76E+05 | 2,62E+06 | 4,72E+05 | 2,22E+04 | 2,09E+04  |
| 16/12/2021             | 1,94E+06 | 9,00E+04 | 5,29E+05 | 2,57E+05 | 3,40E+03 | 2,63E+04  |
| 23/12/2021             | 8,50E+05 | 5,00E+03 | 9,25E+05 | 1,60E+05 | 1,28E+04 | 1,73E+04  |
| 31/12/2021             | 3,10E+06 | 3,50E+04 | 9,10E+05 | 2,58E+05 | 6,53E+04 | 4,90E+04  |
| 07/01/2022             | 4,81E+06 | 2,64E+05 | 1,74E+06 | 5,40E+05 | 2,94E+04 | 3,49E+04  |
| 14/01/2022             | 1,13E+06 | 1,75E+04 | 3,95E+06 | 3,50E+05 | 3,43E+04 | 2,50E+04  |
| 21/01/2022             | 1,72E+06 | 2,00E+04 | 9,90E+05 | 2,94E+05 | 4,62E+04 | 3,14E+04  |
| 28/01/2022             | -        | 1,38E+05 | 1,26E+06 | 5,08E+05 | 9,00E+04 | 5,50E+04  |
| 03/02/2022             | 7,50E+05 | 1,23E+05 | 1,79E+06 | 2,73E+05 | 5,13E+04 | 5,35E+04  |
| 10/02/2022             | 8,50E+05 | 2,30E+05 | 2,50E+05 | 2,50E+03 | 3,00E+03 | 3,00E+04  |
| 11/03/2022             | 3,50E+06 | 1,86E+06 | 1,35E+05 | 1,80E+04 | 1,45E+04 | 8,22E+04  |
| 18/03/2022             | 2,75E+06 | 3,20E+05 | 1,20E+06 | 7,50E+03 | 6,75E+04 | 3,75E+04  |
| 23/03/2022             | 2,40E+06 | 4,15E+05 | 1,30E+06 | 4,25E+05 | 4,35E+04 | 5,75E+04  |
| 30/03/2022             | 1,60E+06 | 5,00E+05 | 2,60E+06 | 7,50E+05 | 1,43E+05 | 8,25E+04  |
| 06/04/2022             | 3,60E+06 | 8,25E+05 | 3,23E+06 | 3,28E+05 | 5,00E+03 | 5,50E+04  |
| 13/04/2022             | 5,57E+06 | 1,20E+06 | 2,85E+06 | 7,17E+05 | 4,00E+03 | 5,10E+04  |
| 20/04/2022             | 4,72E+06 | 1,35E+06 | 3,57E+06 | 9,80E+05 | 7,20E+04 | 4,40E+04  |
| 27/04/2022             | 4,24E+06 | 1,13E+06 | 7,07E+06 | 1,41E+06 | 9,90E+04 | 1,23E+05  |
| 04/05/2022             | 1,88E+06 | 1,15E+06 | 2,50E+06 | 7,75E+05 | 8,00E+04 | 1,53E+05  |
| 11/05/2022             | 4,33E+06 | 7,00E+04 | 6,30E+06 | 2,80E+05 | 5,50E+04 | 4,40E+04  |
| 18/05/2022             | 4,79E+06 | 4,10E+05 | 2,11E+06 | 1,36E+06 | 3,50E+04 | 7,60E+04  |
| 29/05/2022             | 7,48E+06 | 1,86E+06 | 4,94E+06 | 1,99E+06 | 1,55E+05 | 1,69E+05  |
| 03/06/2022             | 4,08E+06 | 1,35E+06 | 3,63E+06 | 1,80E+06 | 1,83E+05 | 1,50E+05  |
| ET ETE 3               |          |          |          |          |          |           |
| 27/10/2021             | 5,88E+03 | 1,32E+03 | 7,50E+02 | 1,07E+03 | 5,80E+02 | 0,00E+00  |
| 04/11/2021             | 1,52E+05 | 1,26E+03 | 5,15E+03 | 1,77E+03 | 0,00E+00 | 3,00E+01  |
| 10/11/2021             | 1,16E+05 | 2,20E+04 | 1,01E+04 | 4,08E+04 | 8,40E+03 | 4,48E+03  |
| 17/11/2021             | 6,37E+04 | 1,90E+04 | 2,47E+04 | 2,51E+04 | 2,27E+04 | 7,00E+01  |
| 24/11/2021             | 2,60E+04 | 8,00E+03 | 5,30E+03 | -        | 1,08E+03 | 4,30E+02  |
| 01/12/2021             | 2,69E+04 | 1,92E+04 | 6,60E+03 | 2,33E+04 | 2,36E+04 | 1,00E+01  |
| 09/12/2021             | 2,62E+04 | 5,50E+03 | 1,10E+04 | 7,00E+03 | 1,40E+03 | 1,90E+02  |
| 16/12/2021             | 3,77E+04 | 1,33E+04 | 1,22E+04 | 1,95E+04 | 2,58E+03 | 3,90E+02  |
| 23/12/2021             | 7,25E+03 | 4,75E+02 | 5,00E+03 | 9,75E+03 | 8,50E+02 | 0,00E+00  |
| 31/12/2021             | 6,50E+04 | 3,00E+03 | 1,75E+04 | 2,03E+04 | 1,31E+04 | 4,25E+02  |
| 07/01/2022             | 2,85E+04 | 4,50E+02 | 4,71E+03 | 7,20E+03 | 3,03E+03 | 2,40E+02  |
| 14/01/2022             | 2,13E+04 | 4,00E+02 | 6,00E+03 | 1,25E+03 | 7,75E+02 | 2,25E+02  |
| 21/01/2022             | 2,55E+04 | 5,50E+02 | 7,20E+02 | 7,96E+03 | 9,80E+02 | 0,00E+00  |
| 28/01/2022             | -        | 6,25E+02 | 2,20E+03 | 7,18E+03 | 2,00E+02 | 7,50E+01  |

| Data                   | BHTs     | BRAMO    | BRAZT    | BRCFX    | BRMRP    | BRTRIAZOL |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| (UFC/mL)               |          |          |          |          |          |           |
| EB ETE 3 (continuação) |          |          |          |          |          |           |
| 03/02/2022             | 3,45E+04 | 2,50E+03 | 8,65E+03 | 8,00E+03 | 2,48E+03 | 2,75E+02  |
| 10/02/2022             | 3,50E+04 | 6,00E+03 | 7,75E+03 | 5,25E+02 | 1,98E+03 | 1,45E+03  |
| 23/03/2022             | 4,00E+04 | 3,10E+03 | 5,25E+03 | 2,50E+03 | 2,68E+03 | 7,50E+01  |
| 30/03/2022             | 6,25E+03 | 1,53E+03 | 5,00E+02 | 2,98E+03 | 6,50E+02 | 1,20E+03  |
| 06/04/2022             | 7,00E+04 | 1,68E+04 | 1,03E+05 | 1,43E+04 | 1,10E+04 | 1,75E+02  |
| 13/04/2022             | 4,27E+04 | 4,29E+03 | 7,65E+04 | 8,60E+03 | 3,80E+02 | 5,00E+01  |
| 20/04/2022             | 3,71E+04 | 7,52E+03 | 6,10E+03 | 1,19E+04 | 2,94E+03 | 4,60E+02  |
| 27/04/2022             | 5,49E+04 | 5,02E+03 | 2,73E+04 | 1,42E+04 | 1,66E+03 | 4,50E+02  |
| 04/05/2022             | 2,25E+04 | 3,20E+03 | 1,73E+04 | 1,50E+04 | 1,25E+03 | 1,50E+02  |
| 11/05/2022             | 2,16E+05 | 4,68E+04 | 4,83E+04 | 1,18E+05 | 1,81E+04 | 5,80E+02  |
| 18/05/2022             | 5,78E+04 | 6,63E+03 | 1,78E+04 | 1,60E+04 | 4,27E+03 | 2,50E+02  |
| 29/05/2022             | 1,24E+05 | 9,81E+03 | 2,18E+04 | 2,10E+04 | 2,40E+04 | 1,84E+03  |
| 03/06/2022             | 1,70E+05 | 3,05E+04 | 2,33E+04 | 4,63E+04 | 1,35E+04 | 2,75E+02  |

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL).

## APÊNDICE B – Resultados das análises estatísticas para BHTs e BRAs

**Tabela B1 – Estatística descritiva das concentrações de BHTs e BRAs (UFC/mL) nas amostras das ETEs estudadas**

| Bactéria  | Amostra  | n  | Média    | Mediana  | DP       | Mínimo   | Máximo   | Assimetria |
|-----------|----------|----|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| BHT       | ETE 1    | 27 | 6,97E+06 | 3,04E+06 | 1,87E+07 | 7,30E+05 | 1,00E+08 | 5,112      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 3,86E+06 | 3,01E+06 | 2,51E+06 | 9,50E+05 | 1,34E+07 | 2,522      |
|           | ETE 3    | 27 | 3,45E+06 | 3,10E+06 | 2,31E+06 | 4,33E+05 | 9,30E+06 | 0,963      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 5,82E+04 | 3,74E+04 | 5,38E+04 | 5,88E+03 | 2,16E+05 | 1,648      |
| BRAMO     | ETE 1    | 26 | 2,22E+06 | 7,50E+05 | 7,04E+06 | 5,00E+04 | 3,66E+07 | 5,041      |
|           | EB ETE 2 | 26 | 1,17E+06 | 5,50E+05 | 2,69E+06 | 2,50E+04 | 1,41E+07 | 4,776      |
|           | ETE 3    | 28 | 5,19E+05 | 2,92E+05 | 5,75E+05 | 5,00E+03 | 1,86E+06 | 1,192      |
|           | ET ETE 3 | 27 | 8,84E+03 | 5,02E+03 | 1,09E+04 | 4,00E+02 | 4,68E+04 | 2,070      |
| BRAZT     | ETE 1    | 27 | 1,70E+06 | 1,10E+06 | 2,73E+06 | 1,98E+05 | 1,48E+07 | 4,527      |
|           | EB ETE 2 | 26 | 1,80E+06 | 1,04E+06 | 2,56E+06 | 3,03E+05 | 1,30E+07 | 3,759      |
|           | ETE 3    | 28 | 2,74E+06 | 1,77E+06 | 3,34E+06 | 1,35E+05 | 1,72E+07 | 3,263      |
|           | ET ETE 3 | 27 | 1,76E+04 | 8,65E+03 | 2,35E+04 | 5,00E+02 | 1,03E+05 | 2,591      |
| BRCFX     | ETE 1    | 27 | 1,05E+06 | 5,80E+05 | 1,47E+06 | 1,20E+04 | 6,64E+06 | 2,771      |
|           | EB ETE 2 | 26 | 6,49E+05 | 4,94E+05 | 6,52E+05 | 7,50E+03 | 3,10E+06 | 2,239      |
|           | ETE 3    | 28 | 6,34E+05 | 3,88E+05 | 6,62E+05 | 2,50E+03 | 2,74E+06 | 1,772      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 1,74E+04 | 1,08E+04 | 2,35E+04 | 5,25E+02 | 1,18E+05 | 3,435      |
| BRMRP     | ETE 1    | 27 | 1,40E+05 | 7,75E+04 | 1,69E+05 | 2,10E+04 | 8,50E+05 | 3,210      |
|           | EB ETE 2 | 26 | 7,07E+04 | 3,15E+04 | 7,81E+04 | 5,00E+03 | 2,85E+05 | 1,500      |
|           | ETE 3    | 28 | 5,78E+04 | 4,49E+04 | 5,39E+04 | 3,00E+03 | 1,96E+05 | 1,303      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 6,31E+03 | 2,53E+03 | 7,89E+03 | 2,00E+02 | 2,40E+04 | 1,363      |
| BRTRIAZOL | ETE 1    | 27 | 9,95E+04 | 6,75E+04 | 1,56E+05 | 1,10E+04 | 8,54E+05 | 4,692      |
|           | EB ETE 2 | 26 | 5,52E+04 | 4,93E+04 | 3,13E+04 | 1,75E+04 | 1,33E+05 | 0,946      |
|           | ETE 3    | 28 | 7,53E+04 | 5,12E+04 | 8,95E+04 | 1,67E+04 | 4,80E+05 | 3,707      |
|           | ET ETE 3 | 24 | 5,75E+02 | 2,63E+02 | 9,50E+02 | 1,00E+01 | 4,48E+03 | 3,386      |

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL).

**Tabela B2 – Resultados dos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Dunn*, quando aplicável, para as concentrações de bactérias heterotróficas totais e resistentes aos antibióticos, entre as ETEs estudadas ( $\alpha = 0,05$ )**

| EB ETEs                 | Bactérias totais e resistentes | Resultado do teste (p: Kruskal-Wallis)   | (p: Dunn) |                |                    |
|-------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|-----------|----------------|--------------------|
| ETE 1<br>ETE 2<br>ETE 3 | BHTs                           | Não há diferença significativa (p=0,761) |           |                |                    |
|                         | Amoxicilina                    | Há diferença significativa (p=0,031)     | ETE 1     | ETE 3          | p=0,009            |
|                         | Azitromicina                   | Não há diferença significativa (p=0,104) |           |                |                    |
|                         | Cefalexina                     | Não há diferença significativa (p=0,532) |           |                |                    |
|                         | Meropenem                      | Há diferença significativa (p=0,004)     | ETE 1     | ETE 2<br>ETE 3 | p=0,007<br>p=0,003 |
|                         | Trimetoprim + sulfametoxazol   | Não há diferença significativa (p=0,198) |           |                |                    |

**Tabela B3 – Estatística descritiva referente à concentração relativa de BRAs (BRAs/BHTs) no EB e ET das ETEs estudadas**

| Bactéria  | Amostra  | n  | Média    | Mediana  | DP       | Mínimo   | Máximo   | Assimetria |
|-----------|----------|----|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| BRAMO     | ETE 1    | 26 | 2,96E-01 | 2,62E-01 | 2,33E-01 | 2,33E-02 | 8,96E-01 | 1,156      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 2,23E-01 | 2,05E-01 | 2,27E-01 | 8,62E-03 | 1,05E+00 | 2,325      |
|           | ETE 3    | 27 | 1,84E-01 | 1,16E-01 | 2,04E-01 | 5,88E-03 | 8,08E-01 | 1,579      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 1,69E-01 | 1,57E-01 | 1,48E-01 | 8,29E-03 | 7,14E-01 | 2,052      |
| BRAZT     | ETE 1    | 27 | 3,92E-01 | 2,90E-01 | 2,57E-01 | 5,41E-02 | 1,05E+00 | 0,996      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 4,48E-01 | 3,56E-01 | 3,97E-01 | 1,17E-01 | 2,00E+00 | 2,853      |
|           | ETE 3    | 27 | 1,00E+00 | 5,87E-01 | 1,00E+00 | 3,86E-02 | 4,04E+00 | 1,792      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 3,64E-01 | 2,34E-01 | 4,15E-01 | 2,82E-02 | 1,79E+00 | 2,512      |
| BRCFX     | ETE 1    | 27 | 2,43E-01 | 1,71E-01 | 2,82E-01 | 8,57E-03 | 1,38E+00 | 2,964      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 2,03E-01 | 1,42E-01 | 2,39E-01 | 1,17E-03 | 1,19E+00 | 3,127      |
|           | ETE 3    | 27 | 2,07E-01 | 1,71E-01 | 1,72E-01 | 2,73E-03 | 7,16E-01 | 1,119      |
|           | ET ETE 3 | 25 | 3,43E-01 | 2,72E-01 | 2,88E-01 | 1,16E-02 | 1,34E+00 | 2,016      |
| BRMRP     | ETE 1    | 27 | 4,01E-02 | 2,96E-02 | 4,77E-02 | 3,31E-03 | 2,56E-01 | 3,824      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 2,11E-02 | 9,24E-03 | 2,45E-02 | 7,81E-04 | 8,81E-02 | 1,951      |
|           | ETE 3    | 27 | 2,19E-02 | 1,53E-02 | 2,25E-02 | 7,18E-04 | 8,91E-02 | 1,613      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 1,20E-01 | 7,31E-02 | 1,71E-01 | 0,00E+00 | 8,77E-01 | 3,846      |
| BRTRIAZOL | ETE 1    | 27 | 3,07E-02 | 1,91E-02 | 3,42E-02 | 1,04E-03 | 1,70E-01 | 2,911      |
|           | EB ETE 2 | 25 | 1,74E-02 | 1,46E-02 | 1,16E-02 | 3,91E-03 | 4,42E-02 | 0,828      |
|           | ETE 3    | 27 | 6,26E-02 | 1,59E-02 | 2,10E-01 | 4,69E-03 | 1,11E+00 | 5,129      |
|           | ET ETE 3 | 26 | 1,53E-02 | 6,60E-03 | 3,75E-02 | 0,00E+00 | 1,92E-01 | 4,513      |

**Tabela B4 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis para verificar diferenças significativas entre o EB das 3 ETEs (1, 2 e 3) em relação às concentrações relativas das BRAs investigadas ( $\alpha = 0,05$ )**

| EB ETEs                 | Bactérias resistentes        | Resultado do teste (p: Kruskal-Wallis)   |                |                |                    | (p: Dunn) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------|
| ETE 1<br>ETE 2<br>ETE 3 | Amoxicilina                  | Não há diferença significativa (p=0,058) |                |                |                    |           |
|                         | Azitromicina                 | Há diferença significativa (p=0,006)     | ETE 1<br>ETE 2 | ETE 3          | p=0,004<br>p=0,008 |           |
|                         | Cefalexina                   | Não há diferença significativa (p=0,794) |                |                |                    |           |
|                         | Meropenem                    | Há diferença significativa (p=0,004)     | ETE 1          | ETE 2<br>ETE 3 | p=0,005<br>p=0,013 |           |
|                         | Trimetoprim + sulfametoxazol | Não há diferença significativa (p=0,242) |                |                |                    |           |

**APÊNDICE C – Resultados dos cálculos de eficiência de remoção (%) e valores de remoção em log medianos para BHTs e BRAs na ETE 3**

**Tabela C1 – Eficiências de remoção de BHTs e BRAs na ETE 3**

| <b>Bactéria</b> | <b>Data</b> | <b>Eficiência de remoção (%)</b> | <b>Valores de remoção em log (VRL)</b> |
|-----------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| <b>BHTs</b>     | 27/10/2021  | 99,698                           | 2,521                                  |
|                 | 04/11/2021  | 64,896                           | 0,455                                  |
|                 | 10/11/2021  | 98,619                           | 1,860                                  |
|                 | 17/11/2021  | 99,315                           | 2,164                                  |
|                 | 01/12/2021  | 98,953                           | 1,980                                  |
|                 | 09/12/2021  | 99,413                           | 2,231                                  |
|                 | 16/12/2021  | 98,057                           | 1,711                                  |
|                 | 23/12/2021  | 99,147                           | 2,069                                  |
|                 | 31/12/2021  | 97,903                           | 1,678                                  |
|                 | 07/01/2022  | 99,407                           | 2,227                                  |
|                 | 14/01/2022  | 98,111                           | 1,724                                  |
|                 | 21/01/2022  | 98,517                           | 1,829                                  |
|                 | 03/02/2022  | 95,400                           | 1,337                                  |
|                 | 10/02/2022  | 95,882                           | 1,385                                  |
|                 | 23/03/2022  | 98,333                           | 1,778                                  |
|                 | 30/03/2022  | 99,609                           | 2,408                                  |
|                 | 06/04/2022  | 98,056                           | 1,711                                  |
|                 | 13/04/2022  | 99,233                           | 2,115                                  |
|                 | 20/04/2022  | 99,214                           | 2,105                                  |
|                 | 27/04/2022  | 98,705                           | 1,888                                  |
|                 | 04/05/2022  | 98,800                           | 1,921                                  |
|                 | 11/05/2022  | 95,012                           | 1,302                                  |
|                 | 18/05/2022  | 98,793                           | 1,918                                  |
|                 | 29/05/2022  | 98,342                           | 1,780                                  |
|                 | 03/06/2022  | 95,828                           | 1,380                                  |
| <b>BRAMO</b>    | 27/10/2021  | 95,600                           | 1,357                                  |
|                 | 04/11/2021  | 99,640                           | 2,444                                  |
|                 | 10/11/2021  | 89,000                           | 0,959                                  |
|                 | 17/11/2021  | 94,311                           | 1,245                                  |
|                 | 01/12/2021  | 76,867                           | 0,636                                  |
|                 | 09/12/2021  | 96,875                           | 1,505                                  |
|                 | 16/12/2021  | 85,222                           | 0,830                                  |
|                 | 23/12/2021  | 90,500                           | 1,022                                  |
|                 | 31/12/2021  | 91,429                           | 1,067                                  |
|                 | 07/01/2022  | 99,830                           | 2,768                                  |
|                 | 14/01/2022  | 97,714                           | 1,641                                  |
|                 | 21/01/2022  | 97,250                           | 1,561                                  |
|                 | 28/01/2022  | 99,545                           | 2,342                                  |
|                 | 03/02/2022  | 97,959                           | 1,690                                  |
|                 | 10/02/2022  | 97,391                           | 1,584                                  |
|                 | 23/03/2022  | 99,253                           | 2,127                                  |
|                 | 30/03/2022  | 99,695                           | 2,516                                  |
|                 | 06/04/2022  | 97,970                           | 1,692                                  |
|                 | 13/04/2022  | 99,643                           | 2,447                                  |
|                 | 20/04/2022  | 99,443                           | 2,254                                  |
|                 | 27/04/2022  | 99,556                           | 2,352                                  |
|                 | 04/05/2022  | 99,722                           | 2,556                                  |
|                 | 11/05/2022  | 33,143                           | 0,175                                  |
|                 | 18/05/2022  | 98,383                           | 1,791                                  |
|                 | 29/05/2022  | 99,473                           | 2,278                                  |
|                 | 03/06/2022  | 97,741                           | 1,646                                  |

| Bactéria     | Data       | Eficiência de remoção (%) | Valores de remoção em log (VRL) |
|--------------|------------|---------------------------|---------------------------------|
| <b>BRAZT</b> | 27/10/2021 | 99,773                    | 2,643                           |
|              | 04/11/2021 | 99,706                    | 2,531                           |
|              | 10/11/2021 | 97,485                    | 1,599                           |
|              | 17/11/2021 | 99,856                    | 2,843                           |
|              | 01/12/2021 | 99,070                    | 2,032                           |
|              | 09/12/2021 | 99,580                    | 2,377                           |
|              | 16/12/2021 | 97,694                    | 1,637                           |
|              | 23/12/2021 | 99,459                    | 2,267                           |
|              | 31/12/2021 | 98,074                    | 1,715                           |
|              | 07/01/2022 | 99,729                    | 2,568                           |
|              | 14/01/2022 | 99,848                    | 2,818                           |
|              | 21/01/2022 | 99,927                    | 3,138                           |
|              | 28/01/2022 | 99,825                    | 2,756                           |
|              | 03/02/2022 | 99,517                    | 2,316                           |
|              | 10/02/2022 | 96,900                    | 1,509                           |
|              | 23/03/2022 | 99,596                    | 2,394                           |
|              | 30/03/2022 | 99,981                    | 3,716                           |
|              | 06/04/2022 | 96,822                    | 1,498                           |
|              | 13/04/2022 | 97,316                    | 1,571                           |
|              | 20/04/2022 | 99,829                    | 2,767                           |
|              | 27/04/2022 | 99,614                    | 2,413                           |
|              | 04/05/2022 | 99,310                    | 2,161                           |
|              | 11/05/2022 | 99,233                    | 2,115                           |
|              | 18/05/2022 | 99,156                    | 2,074                           |
|              | 29/05/2022 | 99,559                    | 2,355                           |
|              | 03/06/2022 | 99,359                    | 2,193                           |
| <b>BRCFX</b> | 27/10/2021 | 99,406                    | 2,226                           |
|              | 04/11/2021 | 99,429                    | 2,243                           |
|              | 10/11/2021 | 98,511                    | 1,827                           |
|              | 17/11/2021 | 94,295                    | 1,244                           |
|              | 01/12/2021 | 82,348                    | 0,753                           |
|              | 09/12/2021 | 98,517                    | 1,829                           |
|              | 16/12/2021 | 92,412                    | 1,120                           |
|              | 23/12/2021 | 93,906                    | 1,215                           |
|              | 31/12/2021 | 92,136                    | 1,104                           |
|              | 07/01/2022 | 98,667                    | 1,875                           |
|              | 14/01/2022 | 99,643                    | 2,447                           |
|              | 21/01/2022 | 97,293                    | 1,567                           |
|              | 28/01/2022 | 98,586                    | 1,850                           |
|              | 03/02/2022 | 97,064                    | 1,532                           |
|              | 10/02/2022 | 79,000                    | 0,678                           |
|              | 23/03/2022 | 99,412                    | 2,230                           |
|              | 30/03/2022 | 99,603                    | 2,402                           |
|              | 06/04/2022 | 95,649                    | 1,361                           |
|              | 13/04/2022 | 98,801                    | 1,921                           |
|              | 20/04/2022 | 98,786                    | 1,916                           |
|              | 27/04/2022 | 98,993                    | 1,997                           |
|              | 04/05/2022 | 98,065                    | 1,713                           |
|              | 11/05/2022 | 57,857                    | 0,375                           |
|              | 18/05/2022 | 98,824                    | 1,929                           |
|              | 29/05/2022 | 98,945                    | 1,977                           |
|              | 03/06/2022 | 97,431                    | 1,590                           |



| Bactéria         | Data       | Eficiência de remoção (%) | Valores de remoção em log (VRL) |
|------------------|------------|---------------------------|---------------------------------|
| <b>BRMRP</b>     | 27/10/2021 | 96,398                    | 1,443                           |
|                  | 04/11/2021 | 100,000                   | 4,447                           |
|                  | 10/11/2021 | 95,714                    | 1,368                           |
|                  | 17/11/2021 | 57,008                    | 0,367                           |
|                  | 01/12/2021 | -74,815                   | -0,243                          |
|                  | 09/12/2021 | 93,694                    | 1,200                           |
|                  | 16/12/2021 | 24,118                    | 0,120                           |
|                  | 23/12/2021 | 93,333                    | 1,176                           |
|                  | 31/12/2021 | 79,962                    | 0,698                           |
|                  | 07/01/2022 | 89,694                    | 0,987                           |
|                  | 14/01/2022 | 97,737                    | 1,645                           |
|                  | 21/01/2022 | 97,879                    | 1,673                           |
|                  | 28/01/2022 | 99,778                    | 2,653                           |
|                  | 03/02/2022 | 95,171                    | 1,316                           |
|                  | 10/02/2022 | 34,167                    | 0,182                           |
|                  | 23/03/2022 | 93,851                    | 1,211                           |
|                  | 30/03/2022 | 99,544                    | 2,341                           |
|                  | 06/04/2022 | -120,000                  | -0,342                          |
|                  | 13/04/2022 | 90,500                    | 1,022                           |
|                  | 20/04/2022 | 95,917                    | 1,389                           |
|                  | 27/04/2022 | 98,323                    | 1,776                           |
|                  | 04/05/2022 | 98,438                    | 1,806                           |
|                  | 11/05/2022 | 67,091                    | 0,483                           |
|                  | 18/05/2022 | 87,800                    | 0,914                           |
|                  | 29/05/2022 | 84,516                    | 0,810                           |
|                  | 03/06/2022 | 92,603                    | 1,131                           |
| <b>BRTRIAZOL</b> | 27/10/2021 | 100,000                   | 4,223                           |
|                  | 04/11/2021 | 99,994                    | 4,204                           |
|                  | 10/11/2021 | 93,600                    | 1,194                           |
|                  | 17/11/2021 | 99,864                    | 2,865                           |
|                  | 01/12/2021 | 99,955                    | 3,348                           |
|                  | 09/12/2021 | 99,091                    | 2,041                           |
|                  | 16/12/2021 | 98,517                    | 1,829                           |
|                  | 23/12/2021 | 100,000                   | 4,237                           |
|                  | 31/12/2021 | 99,133                    | 2,062                           |
|                  | 07/01/2022 | 99,312                    | 2,163                           |
|                  | 14/01/2022 | 99,100                    | 2,046                           |
|                  | 21/01/2022 | 100,000                   | 4,497                           |
|                  | 28/01/2022 | 99,864                    | 2,865                           |
|                  | 03/02/2022 | 99,486                    | 2,289                           |
|                  | 10/02/2022 | 95,167                    | 1,316                           |
|                  | 23/03/2022 | 99,870                    | 2,885                           |
|                  | 30/03/2022 | 98,545                    | 1,837                           |
|                  | 06/04/2022 | 99,682                    | 2,497                           |
|                  | 13/04/2022 | 99,902                    | 3,009                           |
|                  | 20/04/2022 | 98,955                    | 1,981                           |
|                  | 27/04/2022 | 99,634                    | 2,437                           |
|                  | 04/05/2022 | 99,902                    | 3,007                           |
|                  | 11/05/2022 | 98,682                    | 1,880                           |
|                  | 18/05/2022 | 99,671                    | 2,483                           |
|                  | 29/05/2022 | 98,911                    | 1,963                           |
|                  | 03/06/2022 | 99,817                    | 2,737                           |

Bactérias heterotróficas totais (BHT); Bactérias resistentes à: Amoxicilina (BRAMO), Azitromicina (BRAZT), Cefalexina (BRCFX), Meropenem (BRMRP), Sulfametoxazol+trimetoprim (BRTRIAZOL).

**APÊNDICE D – Espécies de bactérias resistentes a pelo menos um dos 5 antibióticos, isoladas, identificadas e especificadas a partir das amostras de EB das ETEs 1, 2 e 3 e ET da ETE 3**

**Tabela D1 – Espécies de bactérias resistentes isoladas, identificadas e especificadas a partir das amostras de EB e ET das ETEs 1, 2 e 3**

| Filo           | Família/espécie                   | ETE 1 |    |   |   |   | ETE 2 |    |   |   |   | ETE 3 |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|----------------|-----------------------------------|-------|----|---|---|---|-------|----|---|---|---|-------|----|---|---|---|----|----|---|---|---|
|                |                                   | EB    |    |   |   |   | EB    |    |   |   |   | EB    |    |   |   |   | ET |    |   |   |   |
|                |                                   | AM    | AZ | C | M | T | AM    | AZ | C | M | T | AM    | AZ | C | M | T | AM | AZ | C | M | T |
| PROTEOBACTERIA | <b>Aeromonadaceae</b>             |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Aeromonas caviae</i>           | x     |    |   |   |   |       |    |   |   | x |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Aeromonas hydrophila</i>       |       |    | x |   |   |       |    | x |   |   |       |    |   |   |   | x  |    |   |   |   |
|                | <i>Aeromonas veronii</i>          |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   | x  | x  |   |   |   |
|                | <b>Enterobacteriaceae</b>         |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Citrobacter freundii</i>       |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   | x     | x  | x |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Enterobacter asburiae</i>      |       |    |   |   | x | x     |    |   |   |   |       |    | x |   |   | x  | x  | x |   |   |
|                | <i>Enterobacter cloacae</i>       |       |    |   |   |   |       |    | x | x |   |       |    |   |   |   | x  |    | x |   |   |
|                | <i>Enterobacter kobei</i>         |       |    |   |   |   |       | x  |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Enterobacter ludwigii</i>      |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   | x |   |
|                | <i>Escherichia coli</i>           | x     | x  |   |   | x |       |    | x |   | x | x     |    | x |   | x |    |    |   | x | x |
|                | <i>Klebsiella oxytoca</i>         |       |    |   |   |   |       | x  | x |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | x     |    | x |   |   | x     |    |   |   |   | x     |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Kluyvera georgiana</i>         |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |    |    |   |   | x |
|                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   | x     |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Pseudomonas alcaligenes</i>    |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   | x |
|                | <i>Pseudomonas fulva</i>          |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    | x |   |   |
|                | <i>Pseudomonas monteilii</i>      |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       | x  |   | x |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Pseudomonas otitidis</i>       |       |    | x |   |   | x     |    |   | x |   | x     |    |   |   |   |    | x  | x |   |   |
|                | <i>Pseudomonas putida</i>         |       |    |   |   | x |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Raoultella ornithinolytica</i> |       |    |   |   |   | x     |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <b>Moracellaceae</b>              |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Acinetobacter baumannii</i>    |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Acinetobacter johnsonii</i>    |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    | x  |   |   |   |
|                | <i>Acinetobacter junii</i>        |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    | x  |   |   |   |
|                | <b>Morganellaceae</b>             |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                | <i>Morganella morganii</i>        |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       | x  |   |   |   |    |    |   |   |   |

| Filo                  | Família/espécie                       | ETE 1 |    |   |   |   | ETE 2 |    |   |   |   | ETE 3 |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|-----------------------|---------------------------------------|-------|----|---|---|---|-------|----|---|---|---|-------|----|---|---|---|----|----|---|---|---|
|                       |                                       | EB    |    |   |   |   | EB    |    |   |   |   | EB    |    |   |   |   | ET |    |   |   |   |
|                       |                                       | AM    | AZ | C | M | T | AM    | AZ | C | M | T | AM    | AZ | C | M | T | AM | AZ | C | M | T |
|                       | <i>Providencia alcalifaciens</i>      |       |    |   |   | x |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   | x  |    |   |   |   |
|                       | <i>Providencia rettgeri</i>           |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   | x     |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Providencia vermicola</i>          |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <b>Vibrionaceae</b>                   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>   | x     |    |   |   |   | x     |    |   | x |   |       |    |   |   |   | x  |    |   | x |   |
| <b>FIRMICUTES</b>     | <b>Enterococcaceae</b>                |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Enterococcus faecium</i>           |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <b>Staphylococcaceae</b>              |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Staphylococcus epidermidis</i>     |       |    |   | x |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <b>Streptococcaceae</b>               |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Streptococcus suis</i>             |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
| <b>BACTEROIDETES</b>  | <b>Weeksellaceae</b>                  |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Chryseobacterium arachidis</i>     |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   | x |   |
|                       | <i>Chryseobacterium gleum</i>         |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Chryseobacterium indologenes</i>   |       |    |   |   |   |       |    | x |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Chryseobacterium sp</i>            |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Elizabethkingia miricola</i>       |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> |       |    |   | x |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Wautersiella falsenii</i>          |       |    |   |   | x |       |    |   | x |   |       |    |   |   | x |    |    |   | x |   |
|                       | <b>Sphingobacteriaceae</b>            |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Sphingobacterium multivorum</i>    |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
| <b>ACTINOBACTERIA</b> | <b>Microbacteriaceae</b>              |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Microbacterium paraoxydans</i>     |       |    |   |   | x |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <b>Micrococcaceae</b>                 |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |    |    |   |   |   |
|                       | <i>Micrococcus luteus</i>             |       |    |   |   |   |       |    |   |   |   |       |    |   |   | x |    |    |   |   |   |

Bactérias resistentes à: Amoxicilina (AM), Azitromicina (AZ), Cefalexina (C), Meropenem (M), Sulfametoxazol+trimetoprim (T).

**APÊNDICE E – Resultados obtidos nos ensaios de qPCR para a quantificação dos genes RNAr 16S, *int1*, *sul1*, *tetA*, *blaTEM*, *ermB* e *qnrB***

**Tabela E1 – Resultados da quantificação de RNAr 16S, *int1* e GRAs no EB e ET para as ETES estudadas (1, 2 e 3)**

| Amostra           |       | Data       | Threshold | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup> | Cópias/mL | DP       |
|-------------------|-------|------------|-----------|----------------|-----------------|----------------|-----------|----------|
| RNAr 16S Bacteria |       |            |           |                |                 |                |           |          |
| EB                | ETE 1 | 04/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,43E+09  | 1,55E+08 |
|                   | ETE 2 | 04/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,12E+09  | 2,49E+08 |
|                   | ETE 3 | 04/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,39E+09  | 7,69E+07 |
| ET                | ETE 3 | 04/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,42E+09  | 3,55E+07 |
|                   | ETE 1 | 17/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,41E+09  | 6,76E+07 |
|                   | ETE 2 | 17/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,63E+09  | 3,61E+08 |
| EB                | ETE 3 | 17/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 8,84E+08  | 8,50E+07 |
|                   | ETE 3 | 17/11/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,66E+08  | 4,89E+07 |
|                   | ETE 1 | 01/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,02E+09  | 2,18E+08 |
| EB                | ETE 2 | 01/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 9,05E+08  | 9,31E+07 |
|                   | ETE 3 | 01/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 5,65E+08  | 9,18E+07 |
|                   | ETE 3 | 01/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,77E+08  | 7,31E+07 |
| ET                | ETE 1 | 15/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 9,49E+08  | 2,19E+07 |
|                   | ETE 2 | 15/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 9,91E+08  | 3,14E+07 |
|                   | ETE 3 | 15/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 5,98E+08  | 1,07E+08 |
| EB                | ETE 3 | 15/12/2021 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,59E+08  | 3,73E+07 |
|                   | ETE 1 | 05/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,13E+09  | 1,09E+08 |
|                   | ETE 2 | 05/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 8,62E+08  | 1,48E+08 |
| ET                | ETE 3 | 05/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 8,04E+08  | 1,24E+08 |
|                   | ETE 3 | 05/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,47E+08  | 7,06E+07 |
|                   | ETE 1 | 19/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,08E+09  | 1,03E+08 |
| EB                | ETE 2 | 19/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 8,00E+08  | 2,09E+08 |
|                   | ETE 3 | 19/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,02E+08  | 9,19E+07 |
|                   | ETE 3 | 19/01/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 4,77E+08  | 1,06E+08 |
| ET                | ETE 1 | 10/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,21E+09  | 1,73E+08 |
|                   | ETE 2 | 10/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,02E+09  | 1,91E+08 |
|                   | ETE 3 | 10/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 4,00E+08  | 7,91E+07 |
| EB                | ETE 3 | 10/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 3,63E+08  | 2,74E+07 |
|                   | ETE 1 | 21/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 4,26E+08  | 2,23E+07 |
|                   | ETE 2 | 21/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 7,09E+08  | 1,52E+08 |
| ET                | ETE 3 | 21/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 3,44E+08  | 3,53E+07 |
|                   | ETE 3 | 21/02/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 3,07E+08  | 3,21E+07 |
|                   | ETE 1 | 23/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,88E+08  | 7,76E+07 |
| EB                | ETE 2 | 23/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,62E+07  | 3,63E+06 |
|                   | ETE 3 | 23/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,11E+09  | 2,65E+08 |
|                   | ETE 3 | 23/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,16E+09  | 8,65E+07 |
| ET                | ETE 1 | 30/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,40E+09  | 1,23E+08 |
|                   | ETE 2 | 30/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,66E+09  | 1,52E+08 |
|                   | ETE 3 | 30/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,56E+09  | 8,09E+07 |
| EB                | ETE 3 | 30/03/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,35E+09  | 2,02E+08 |
|                   | ETE 1 | 06/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,97E+08  | 3,12E+07 |
|                   | ETE 2 | 06/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,09E+08  | 6,84E+07 |
| ET                | ETE 3 | 06/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,26E+09  | 9,17E+07 |
|                   | ETE 3 | 06/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,33E+09  | 1,11E+08 |
|                   | ETE 1 | 20/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 3,21E+08  | 3,17E+07 |
| EB                | ETE 2 | 20/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,89E+07  | 9,98E+06 |
|                   | ETE 3 | 20/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 9,99E+08  | 6,09E+07 |
|                   | ETE 3 | 20/04/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,28E+09  | 2,43E+08 |
| ET                | ETE 1 | 04/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,78E+09  | 3,80E+08 |
|                   | ETE 2 | 04/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 5,86E+07  | 2,21E+06 |
|                   | ETE 3 | 04/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,49E+08  | 1,24E+08 |
| EB                | ETE 3 | 04/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 2,43E+08  | 9,24E+06 |
|                   | ETE 1 | 18/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,59E+09  | 1,25E+08 |
|                   | ETE 2 | 18/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,11E+08  | 8,08E+06 |
| ET                | ETE 3 | 18/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 1,02E+09  | 1,46E+08 |
|                   | ETE 3 | 18/05/2022 | 148,223   | 91,882         | y=-3,533+46,84  | 0,998          | 6,59E+08  | 4,49E+07 |

| Amostra | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r2              | Cópias/mL | DP       |          |
|---------|-------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------|----------|----------|
| int1    |       |            |                |                 |                 |           |          |          |
| EB      | ETE 1 | 04/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,02E+08 | 3,41E+07 |
|         | ETE 2 | 04/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,86E+08 | 1,83E+07 |
|         | ETE 3 | 04/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,15E+08 | 1,86E+07 |
| ET      | ETE 3 | 04/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,53E+07 | 9,07E+05 |
| EB      | ETE 1 | 17/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,20E+08 | 2,38E+07 |
|         | ETE 2 | 17/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,52E+08 | 1,31E+07 |
|         | ETE 3 | 17/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 5,72E+07 | 1,48E+07 |
| ET      | ETE 3 | 17/11/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,30E+07 | 2,11E+06 |
| EB      | ETE 1 | 01/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,78E+08 | 2,80E+06 |
|         | ETE 2 | 01/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,32E+08 | 8,16E+06 |
|         | ETE 3 | 01/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,41E+07 | 9,26E+06 |
| ET      | ETE 3 | 01/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,30E+07 | 1,22E+06 |
| EB      | ETE 1 | 15/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,66E+08 | 8,38E+06 |
|         | ETE 2 | 15/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,32E+08 | 2,33E+07 |
|         | ETE 3 | 15/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,76E+08 | 3,66E+07 |
| ET      | ETE 3 | 15/12/2021 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 2,15E+07 | 4,88E+06 |
| EB      | ETE 1 | 05/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,40E+08 | 1,76E+07 |
|         | ETE 2 | 05/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,26E+08 | 2,58E+07 |
|         | ETE 3 | 05/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,42E+08 | 6,17E+06 |
| ET      | ETE 3 | 05/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,34E+07 | 1,82E+06 |
| EB      | ETE 1 | 19/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,85E+08 | 1,66E+07 |
|         | ETE 2 | 19/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,57E+08 | 1,12E+07 |
|         | ETE 3 | 19/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,33E+08 | 3,58E+07 |
| ET      | ETE 3 | 19/01/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 6,92E+06 | 1,86E+06 |
| EB      | ETE 1 | 10/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,75E+08 | 2,02E+07 |
|         | ETE 2 | 10/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 4,49E+07 | 9,32E+06 |
|         | ETE 3 | 10/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,01E+07 | 4,56E+06 |
| ET      | ETE 3 | 10/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 2,32E+07 | 2,56E+06 |
| EB      | ETE 1 | 21/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,61E+07 | 1,62E+06 |
|         | ETE 2 | 21/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 4,01E+07 | 4,78E+06 |
|         | ETE 3 | 21/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 3,52E+07 | 2,07E+06 |
| ET      | ETE 3 | 21/02/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 6,35E+06 | 1,53E+05 |
| EB      | ETE 1 | 23/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,54E+08 | 6,24E+06 |
|         | ETE 2 | 23/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 2,89E+05 | 4,08E+03 |
|         | ETE 3 | 23/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,98E+07 | 1,53E+07 |
| ET      | ETE 3 | 23/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,73E+06 | 3,24E+05 |
| EB      | ETE 1 | 30/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,45E+08 | 1,38E+07 |
|         | ETE 2 | 30/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 7,94E+07 | 3,25E+06 |
|         | ETE 3 | 30/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 7,92E+07 | 4,56E+05 |
| ET      | ETE 3 | 30/03/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 7,86E+05 | 8,03E+04 |
| EB      | ETE 1 | 06/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,66E+08 | 1,08E+07 |
|         | ETE 2 | 06/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 3,44E+07 | 4,05E+06 |
|         | ETE 3 | 06/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 9,62E+07 | 1,93E+07 |
| ET      | ETE 3 | 06/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 4,73E+06 | 6,21E+05 |
| EB      | ETE 1 | 20/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,96E+07 | 1,12E+07 |
|         | ETE 2 | 20/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 3,34E+06 | 2,05E+05 |
|         | ETE 3 | 20/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,16E+07 | 4,70E+06 |
| ET      | ETE 3 | 20/04/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 4,56E+06 | 4,96E+05 |
| EB      | ETE 1 | 04/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 9,57E+07 | 9,84E+06 |
|         | ETE 2 | 04/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 7,35E+06 | 2,02E+06 |
|         | ETE 3 | 04/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,99E+07 | 5,01E+06 |
| ET      | ETE 3 | 04/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,97E+07 | 4,50E+05 |
| EB      | ETE 1 | 18/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,15E+08 | 2,10E+07 |
|         | ETE 2 | 18/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 8,47E+06 | 1,69E+05 |
|         | ETE 3 | 18/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 1,17E+08 | 2,84E+07 |
| ET      | ETE 3 | 18/05/2022 | 171,919        | 119,047         | y=-2,937x+41,81 | 0,998     | 2,53E+07 | 2,51E+06 |

| Amostra | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup>   | Cópias/mL | DP       |          |
|---------|-------|------------|----------------|-----------------|------------------|-----------|----------|----------|
| su1     |       |            |                |                 |                  |           |          |          |
| EB      | ETE 1 | 04/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,65E+08 | 4,78E+06 |
|         | ETE 2 | 04/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,78E+08 | 1,58E+07 |
|         | ETE 3 | 04/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,37E+08 | 3,06E+07 |
| ET      | ETE 3 | 04/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,82E+07 | 1,05E+06 |
| EB      | ETE 1 | 17/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,59E+08 | 4,19E+06 |
|         | ETE 2 | 17/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,43E+08 | 1,32E+07 |
|         | ETE 3 | 17/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,16E+08 | 9,41E+06 |
| ET      | ETE 3 | 17/11/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,36E+07 | 1,70E+06 |
| EB      | ETE 1 | 01/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,93E+08 | 3,53E+06 |
|         | ETE 2 | 01/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,72E+08 | 1,01E+07 |
|         | ETE 3 | 01/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,59E+08 | 5,18E+06 |
| ET      | ETE 3 | 01/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,52E+07 | 2,41E+06 |
| EB      | ETE 1 | 15/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,64E+08 | 5,35E+06 |
|         | ETE 2 | 15/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,52E+08 | 2,21E+07 |
|         | ETE 3 | 15/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,11E+08 | 6,14E+06 |
| ET      | ETE 3 | 15/12/2021 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 3,25E+07 | 2,61E+06 |
| EB      | ETE 1 | 05/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,44E+08 | 1,11E+07 |
|         | ETE 2 | 05/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,49E+08 | 4,38E+06 |
|         | ETE 3 | 05/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,17E+08 | 2,05E+07 |
| ET      | ETE 3 | 05/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,40E+07 | 4,67E+06 |
| EB      | ETE 1 | 19/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,66E+08 | 1,11E+07 |
|         | ETE 2 | 19/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,58E+08 | 2,04E+07 |
|         | ETE 3 | 19/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,73E+08 | 4,16E+06 |
| ET      | ETE 3 | 19/01/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,73E+07 | 3,54E+06 |
| EB      | ETE 1 | 10/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,51E+08 | 8,07E+06 |
|         | ETE 2 | 10/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,51E+08 | 6,95E+06 |
|         | ETE 3 | 10/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,21E+08 | 1,95E+07 |
| ET      | ETE 3 | 10/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 5,52E+07 | 1,11E+07 |
| EB      | ETE 1 | 21/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 6,47E+07 | 2,10E+06 |
|         | ETE 2 | 21/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 6,97E+07 | 8,30E+06 |
|         | ETE 3 | 21/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 9,24E+07 | 5,12E+06 |
| ET      | ETE 3 | 21/02/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,91E+07 | 3,98E+06 |
| EB      | ETE 1 | 23/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,15E+08 | 7,99E+06 |
|         | ETE 2 | 23/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,23E+07 | 9,26E+05 |
|         | ETE 3 | 23/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,92E+08 | 1,00E+07 |
| ET      | ETE 3 | 23/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 8,04E+06 | 7,29E+05 |
| EB      | ETE 1 | 30/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,26E+08 | 2,00E+07 |
|         | ETE 2 | 30/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,79E+08 | 1,11E+07 |
|         | ETE 3 | 30/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,00E+08 | 2,21E+07 |
| ET      | ETE 3 | 30/03/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,14E+07 | 9,74E+05 |
| EB      | ETE 1 | 06/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,32E+08 | 1,44E+07 |
|         | ETE 2 | 06/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,03E+08 | 9,23E+06 |
|         | ETE 3 | 06/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,94E+08 | 2,05E+07 |
| ET      | ETE 3 | 06/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 3,45E+07 | 4,15E+06 |
| EB      | ETE 1 | 20/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,85E+08 | 2,70E+07 |
|         | ETE 2 | 20/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,81E+07 | 1,37E+06 |
|         | ETE 3 | 20/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,71E+08 | 1,39E+07 |
| ET      | ETE 3 | 20/04/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,38E+07 | 3,79E+06 |
| EB      | ETE 1 | 04/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,83E+08 | 2,42E+07 |
|         | ETE 2 | 04/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,68E+07 | 7,09E+05 |
|         | ETE 3 | 04/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,39E+08 | 8,93E+06 |
| ET      | ETE 3 | 04/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 4,93E+07 | 5,87E+06 |
| EB      | ETE 1 | 18/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 2,16E+08 | 4,34E+07 |
|         | ETE 2 | 18/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,91E+07 | 9,19E+05 |
|         | ETE 3 | 18/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 1,73E+08 | 5,77E+06 |
| ET      | ETE 3 | 18/05/2022 | 205,065        | 115,708         | y=-2,995x+42,129 | 0,991     | 6,44E+07 | 5,24E+06 |

| Amostra | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup>   | Cópias/mL | DP       |          |
|---------|-------|------------|----------------|-----------------|------------------|-----------|----------|----------|
| tetA    |       |            |                |                 |                  |           |          |          |
| EB      | ETE 1 | 04/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,42E+06 | 5,97E+04 |
|         | ETE 2 | 04/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,80E+06 | 1,48E+05 |
|         | ETE 3 | 04/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,95E+06 | 4,26E+05 |
| ET      | ETE 3 | 04/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,21E+03 | 2,09E+02 |
| EB      | ETE 1 | 17/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,86E+06 | 1,97E+05 |
|         | ETE 2 | 17/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,40E+06 | 1,68E+05 |
|         | ETE 3 | 17/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,83E+06 | 2,77E+05 |
| ET      | ETE 3 | 17/11/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 7,53E+03 | 5,46E+02 |
| EB      | ETE 1 | 01/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,23E+06 | 3,35E+04 |
|         | ETE 2 | 01/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,79E+06 | 6,66E+04 |
|         | ETE 3 | 01/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 9,81E+05 | 1,07E+05 |
| ET      | ETE 3 | 01/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 4,49E+03 | 5,48E+02 |
| EB      | ETE 1 | 15/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,56E+06 | 1,44E+05 |
|         | ETE 2 | 15/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,57E+06 | 1,29E+05 |
|         | ETE 3 | 15/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 5,39E+06 | 1,31E+05 |
| ET      | ETE 3 | 15/12/2021 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,26E+04 | 4,78E+03 |
| EB      | ETE 1 | 05/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,25E+06 | 1,12E+05 |
|         | ETE 2 | 05/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,65E+06 | 1,25E+05 |
|         | ETE 3 | 05/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,51E+06 | 3,12E+05 |
| ET      | ETE 3 | 05/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,90E+03 | 3,93E+02 |
| EB      | ETE 1 | 19/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,27E+06 | 1,65E+05 |
|         | ETE 2 | 19/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,74E+06 | 5,89E+04 |
|         | ETE 3 | 19/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,99E+06 | 1,02E+05 |
| ET      | ETE 3 | 19/01/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 8,91E+02 | 1,38E+02 |
| EB      | ETE 1 | 10/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,18E+06 | 1,06E+05 |
|         | ETE 2 | 10/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 7,78E+05 | 5,78E+04 |
|         | ETE 3 | 10/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,05E+06 | 1,28E+05 |
| ET      | ETE 3 | 10/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,49E+03 | 5,13E+02 |
| EB      | ETE 1 | 21/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 9,28E+05 | 1,34E+05 |
|         | ETE 2 | 21/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 5,97E+05 | 3,26E+04 |
|         | ETE 3 | 21/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 4,24E+05 | 3,17E+04 |
| ET      | ETE 3 | 21/02/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,28E+03 | 3,19E+02 |
| EB      | ETE 1 | 23/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,58E+06 | 3,88E+04 |
|         | ETE 2 | 23/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 7,56E+04 | 1,01E+04 |
|         | ETE 3 | 23/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,82E+06 | 2,04E+04 |
| ET      | ETE 3 | 23/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,77E+03 | 5,15E+02 |
| EB      | ETE 1 | 30/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 9,42E+05 | 8,44E+04 |
|         | ETE 2 | 30/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,15E+06 | 6,72E+04 |
|         | ETE 3 | 30/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 4,23E+06 | 8,83E+05 |
| ET      | ETE 3 | 30/03/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 3,73E+03 | 8,40E+02 |
| EB      | ETE 1 | 06/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,28E+06 | 3,88E+05 |
|         | ETE 2 | 06/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 8,63E+05 | 1,07E+05 |
|         | ETE 3 | 06/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 3,70E+06 | 6,15E+05 |
| ET      | ETE 3 | 06/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 8,16E+03 | 6,59E+02 |
| EB      | ETE 1 | 20/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,20E+06 | 1,78E+05 |
|         | ETE 2 | 20/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,14E+05 | 1,14E+04 |
|         | ETE 3 | 20/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 3,53E+06 | 1,97E+05 |
| ET      | ETE 3 | 20/04/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,41E+03 | 3,05E+02 |
| EB      | ETE 1 | 04/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,25E+06 | 1,73E+05 |
|         | ETE 2 | 04/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,03E+05 | 4,33E+03 |
|         | ETE 3 | 04/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,31E+06 | 1,22E+05 |
| ET      | ETE 3 | 04/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,44E+04 | 2,75E+02 |
| EB      | ETE 1 | 18/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,54E+06 | 2,34E+05 |
|         | ETE 2 | 18/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 1,35E+05 | 8,23E+03 |
|         | ETE 3 | 18/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 2,05E+06 | 2,56E+05 |
| ET      | ETE 3 | 18/05/2022 | 236,941        | 124,220         | y=-2,852x+40,917 | 0,995     | 9,35E+03 | 1,76E+03 |

| Amostra       | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup>    | Cópias/mL | DP       |
|---------------|-------|------------|----------------|-----------------|-------------------|-----------|----------|
| <i>blaTEM</i> |       |            |                |                 |                   |           |          |
| EB            | ETE 1 | 04/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 7,55E+05 |
|               | ETE 2 | 04/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,33E+06 |
|               | ETE 3 | 04/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 9,90E+06 |
| ET            | ETE 3 | 04/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,81E+02 |
| EB            | ETE 1 | 17/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,34E+05 |
|               | ETE 2 | 17/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,09E+06 |
|               | ETE 3 | 17/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,12E+06 |
| ET            | ETE 3 | 17/11/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 5,76E+03 |
| EB            | ETE 1 | 01/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,24E+05 |
|               | ETE 2 | 01/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,95E+06 |
|               | ETE 3 | 01/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,17E+06 |
| ET            | ETE 3 | 01/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 7,02E+03 |
| EB            | ETE 1 | 15/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,43E+06 |
|               | ETE 2 | 15/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,90E+06 |
|               | ETE 3 | 15/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,25E+06 |
| ET            | ETE 3 | 15/12/2021 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,15E+04 |
| EB            | ETE 1 | 05/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,58E+06 |
|               | ETE 2 | 05/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,92E+05 |
|               | ETE 3 | 05/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,02E+07 |
| ET            | ETE 3 | 05/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,60E+03 |
| EB            | ETE 1 | 19/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,12E+06 |
|               | ETE 2 | 19/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,42E+05 |
|               | ETE 3 | 19/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,78E+06 |
| ET            | ETE 3 | 19/01/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,70E+02 |
| EB            | ETE 1 | 10/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,75E+06 |
|               | ETE 2 | 10/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,21E+06 |
|               | ETE 3 | 10/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,03E+06 |
| ET            | ETE 3 | 10/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,38E+03 |
| EB            | ETE 1 | 21/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,21E+06 |
|               | ETE 2 | 21/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,72E+06 |
|               | ETE 3 | 21/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,80E+06 |
| ET            | ETE 3 | 21/02/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,17E+03 |
| EB            | ETE 1 | 23/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,41E+06 |
|               | ETE 2 | 23/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,51E+05 |
|               | ETE 3 | 23/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,79E+06 |
| ET            | ETE 3 | 23/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 5,60E+03 |
| EB            | ETE 1 | 30/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,96E+06 |
|               | ETE 2 | 30/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 6,86E+05 |
|               | ETE 3 | 30/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,80E+07 |
| ET            | ETE 3 | 30/03/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 5,11E+03 |
| EB            | ETE 1 | 06/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 9,51E+06 |
|               | ETE 2 | 06/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,36E+06 |
|               | ETE 3 | 06/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,66E+07 |
| ET            | ETE 3 | 06/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,79E+03 |
| EB            | ETE 1 | 20/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,27E+07 |
|               | ETE 2 | 20/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 4,47E+05 |
|               | ETE 3 | 20/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,27E+07 |
| ET            | ETE 3 | 20/04/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 8,54E+02 |
| EB            | ETE 1 | 04/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 5,56E+06 |
|               | ETE 2 | 04/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,02E+05 |
|               | ETE 3 | 04/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 5,27E+06 |
| ET            | ETE 3 | 04/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 2,41E+04 |
| EB            | ETE 1 | 18/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 9,88E+06 |
|               | ETE 2 | 18/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,15E+05 |
|               | ETE 3 | 18/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 3,75E+06 |
| ET            | ETE 3 | 18/05/2022 | 284,495        | 109,447         | $y=-3,115x+45,39$ | 0,990     | 1,72E+04 |



| Amostra | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup>  | Cópias/mL | DP       |          |
|---------|-------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------|----------|----------|
| ermB    |       |            |                |                 |                 |           |          |          |
| EB      | ETE 1 | 04/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 6,78E+06 | 5,98E+05 |
|         | ETE 2 | 04/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 7,07E+06 | 5,75E+05 |
|         | ETE 3 | 04/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 4,82E+07 | 2,76E+06 |
| ET      | ETE 3 | 04/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 9,25E+03 | 1,37E+03 |
| EB      | ETE 1 | 17/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,15E+07 | 2,72E+05 |
|         | ETE 2 | 17/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 8,07E+06 | 5,81E+05 |
|         | ETE 3 | 17/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 4,06E+07 | 4,77E+06 |
| ET      | ETE 3 | 17/11/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,01E+05 | 4,30E+03 |
| EB      | ETE 1 | 01/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 9,02E+06 | 7,19E+05 |
|         | ETE 2 | 01/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 7,89E+06 | 5,37E+05 |
|         | ETE 3 | 01/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 7,82E+07 | 6,57E+06 |
| ET      | ETE 3 | 01/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 8,49E+04 | 1,39E+04 |
| EB      | ETE 1 | 15/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,01E+07 | 2,12E+05 |
|         | ETE 2 | 15/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,40E+06 | 4,81E+05 |
|         | ETE 3 | 15/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,43E+07 | 6,00E+06 |
| ET      | ETE 3 | 15/12/2021 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,36E+05 | 3,62E+04 |
| EB      | ETE 1 | 05/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 4,50E+06 | 4,36E+05 |
|         | ETE 2 | 05/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,65E+06 | 1,56E+05 |
|         | ETE 3 | 05/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,05E+07 | 6,66E+06 |
| ET      | ETE 3 | 05/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 9,77E+04 | 9,94E+03 |
| EB      | ETE 1 | 19/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 7,03E+06 | 4,79E+05 |
|         | ETE 2 | 19/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,33E+06 | 5,17E+05 |
|         | ETE 3 | 19/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,25E+07 | 5,24E+06 |
| ET      | ETE 3 | 19/01/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,64E+03 | 3,52E+02 |
| EB      | ETE 1 | 10/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 6,49E+06 | 1,41E+05 |
|         | ETE 2 | 10/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,50E+06 | 3,30E+05 |
|         | ETE 3 | 10/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 4,79E+07 | 2,29E+06 |
| ET      | ETE 3 | 10/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,78E+04 | 3,04E+03 |
| EB      | ETE 1 | 21/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,33E+06 | 3,97E+05 |
|         | ETE 2 | 21/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 9,21E+06 | 1,37E+06 |
|         | ETE 3 | 21/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 8,60E+07 | 7,30E+06 |
| ET      | ETE 3 | 21/02/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,27E+04 | 4,39E+03 |
| EB      | ETE 1 | 23/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 8,29E+06 | 6,16E+05 |
|         | ETE 2 | 23/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,72E+05 | 1,27E+04 |
|         | ETE 3 | 23/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 7,61E+07 | 3,59E+06 |
| ET      | ETE 3 | 23/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 6,68E+04 | 9,67E+03 |
| EB      | ETE 1 | 30/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,08E+07 | 1,28E+05 |
|         | ETE 2 | 30/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,26E+06 | 1,67E+05 |
|         | ETE 3 | 30/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 8,07E+07 | 6,45E+06 |
| ET      | ETE 3 | 30/03/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,89E+04 | 2,89E+03 |
| EB      | ETE 1 | 06/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,92E+07 | 6,67E+05 |
|         | ETE 2 | 06/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 4,75E+06 | 1,59E+05 |
|         | ETE 3 | 06/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,48E+07 | 7,30E+05 |
| ET      | ETE 3 | 06/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,76E+04 | 3,62E+03 |
| EB      | ETE 1 | 20/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,38E+07 | 4,57E+05 |
|         | ETE 2 | 20/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 9,77E+05 | 4,78E+04 |
|         | ETE 3 | 20/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 5,45E+07 | 4,36E+06 |
| ET      | ETE 3 | 20/04/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,55E+04 | 4,54E+03 |
| EB      | ETE 1 | 04/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,10E+07 | 1,27E+06 |
|         | ETE 2 | 04/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,16E+06 | 6,45E+04 |
|         | ETE 3 | 04/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 3,78E+07 | 3,16E+06 |
| ET      | ETE 3 | 04/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,19E+05 | 1,46E+04 |
| EB      | ETE 1 | 18/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,55E+07 | 1,00E+06 |
|         | ETE 2 | 18/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,31E+06 | 9,02E+04 |
|         | ETE 3 | 18/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 1,08E+08 | 8,43E+06 |
| ET      | ETE 3 | 18/05/2022 | 167,233        | 108,538         | y=-3,133x+42,65 | 0,998     | 2,68E+05 | 2,25E+04 |

| Amostra | Data  | Threshold  | Eficiência (%) | Equação da reta | r <sup>2</sup>  | Cópias/mL | DP       |          |
|---------|-------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------|----------|----------|
| qnrB    |       |            |                |                 |                 |           |          |          |
| EB      | ETE 1 | 04/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 6,60E+05 | 8,68E+04 |
|         | ETE 2 | 04/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 7,07E+05 | 7,26E+04 |
|         | ETE 3 | 04/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,07E+06 | 1,84E+05 |
| ET      | ETE 3 | 04/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,99E+02 | 8,88E+01 |
| EB      | ETE 1 | 17/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,80E+06 | 2,11E+05 |
|         | ETE 2 | 17/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 6,86E+05 | 4,36E+04 |
|         | ETE 3 | 17/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,48E+06 | 1,82E+05 |
| ET      | ETE 3 | 17/11/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,64E+03 | 2,95E+02 |
| EB      | ETE 1 | 01/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 8,83E+05 | 1,02E+05 |
|         | ETE 2 | 01/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 8,15E+05 | 4,79E+04 |
|         | ETE 3 | 01/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 5,09E+05 | 2,90E+04 |
| ET      | ETE 3 | 01/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,09E+03 | 1,29E+02 |
| EB      | ETE 1 | 15/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,51E+06 | 1,63E+05 |
|         | ETE 2 | 15/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 8,34E+05 | 6,27E+04 |
|         | ETE 3 | 15/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 6,00E+06 | 4,52E+05 |
| ET      | ETE 3 | 15/12/2021 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,87E+04 | 3,20E+03 |
| EB      | ETE 1 | 05/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,01E+06 | 2,06E+05 |
|         | ETE 2 | 05/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 6,02E+05 | 2,65E+04 |
|         | ETE 3 | 05/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 3,26E+06 | 3,14E+05 |
| ET      | ETE 3 | 05/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,71E+03 | 4,61E+02 |
| EB      | ETE 1 | 19/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 7,63E+05 | 1,64E+05 |
|         | ETE 2 | 19/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 7,39E+05 | 3,62E+04 |
|         | ETE 3 | 19/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,12E+06 | 1,56E+05 |
| ET      | ETE 3 | 19/01/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,34E+02 | 1,19E+01 |
| EB      | ETE 1 | 10/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,37E+06 | 1,62E+05 |
|         | ETE 2 | 10/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 5,20E+05 | 8,83E+04 |
|         | ETE 3 | 10/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 7,01E+05 | 6,17E+04 |
| ET      | ETE 3 | 10/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 3,73E+02 | 7,87E+01 |
| EB      | ETE 1 | 21/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 5,91E+05 | 4,33E+04 |
|         | ETE 2 | 21/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,07E+06 | 1,09E+05 |
|         | ETE 3 | 21/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,33E+06 | 2,30E+04 |
| ET      | ETE 3 | 21/02/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,41E+03 | 7,65E+02 |
| EB      | ETE 1 | 23/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,20E+05 | 6,58E+04 |
|         | ETE 2 | 23/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,58E+04 | 1,15E+03 |
|         | ETE 3 | 23/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,39E+06 | 5,87E+05 |
| ET      | ETE 3 | 23/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,36E+03 | 1,30E+02 |
| EB      | ETE 1 | 30/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,42E+05 | 1,01E+04 |
|         | ETE 2 | 30/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,38E+05 | 6,89E+03 |
|         | ETE 3 | 30/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,09E+06 | 3,40E+05 |
| ET      | ETE 3 | 30/03/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,62E+03 | 1,41E+03 |
| EB      | ETE 1 | 06/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,92E+06 | 8,15E+04 |
|         | ETE 2 | 06/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,41E+05 | 1,02E+04 |
|         | ETE 3 | 06/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,23E+06 | 4,76E+04 |
| ET      | ETE 3 | 06/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,59E+02 | 1,74E+00 |
| EB      | ETE 1 | 20/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 9,07E+05 | 4,75E+04 |
|         | ETE 2 | 20/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 3,75E+04 | 2,38E+03 |
|         | ETE 3 | 20/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,17E+06 | 3,44E+04 |
| ET      | ETE 3 | 20/04/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,08E+03 | 8,58E+01 |
| EB      | ETE 1 | 04/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,18E+06 | 8,48E+04 |
|         | ETE 2 | 04/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 5,78E+04 | 4,70E+03 |
|         | ETE 3 | 04/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,12E+06 | 8,09E+04 |
| ET      | ETE 3 | 04/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 6,56E+03 | 2,20E+03 |
| EB      | ETE 1 | 18/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 1,47E+06 | 1,75E+05 |
|         | ETE 2 | 18/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 8,19E+04 | 9,34E+03 |
|         | ETE 3 | 18/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 2,45E+06 | 1,03E+05 |
| ET      | ETE 3 | 18/05/2022 | 298,655        | 103,648         | y=-3,237x+46,35 | 0,993     | 4,51E+03 | 5,19E+02 |

## APÊNDICE F – Resultados das análises estatísticas para os elementos genéticos

**Tabela F1 – Estatística descritiva das abundâncias absolutas de elementos genéticos de resistência (nº de cópias/mL) nas amostras das ETEs estudadas**

| Gene          | Amostra  | n  | Média    | Mediana  | DP       | Mínimo   | Máximo   | Assimetria |
|---------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| <b>16S</b>    | ETE 1    | 14 | 1,05E+09 | 1,10E+09 | 4,84E+08 | 1,97E+08 | 1,78E+09 | -0,435     |
|               | EB ETE 2 | 14 | 8,26E+08 | 8,31E+08 | 6,47E+08 | 2,62E+07 | 2,12E+09 | 0,490      |
|               | ETE 3    | 14 | 8,70E+08 | 8,44E+08 | 3,70E+08 | 3,44E+08 | 1,56E+09 | 0,381      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 7,17E+08 | 5,62E+08 | 4,79E+08 | 2,43E+08 | 1,42E+09 | 0,483      |
| <b>int1</b>   | ETE 1    | 14 | 1,32E+08 | 1,42E+08 | 4,61E+07 | 1,61E+07 | 1,85E+08 | -1,181     |
|               | EB ETE 2 | 14 | 7,88E+07 | 6,22E+07 | 6,64E+07 | 2,89E+05 | 1,86E+08 | 0,210      |
|               | ETE 3    | 14 | 9,83E+07 | 8,98E+07 | 3,60E+07 | 3,52E+07 | 1,76E+08 | 0,516      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 1,21E+07 | 1,30E+07 | 8,16E+06 | 7,86E+05 | 2,53E+07 | 0,206      |
| <b>sul1</b>   | ETE 1    | 14 | 1,76E+08 | 1,75E+08 | 4,29E+07 | 6,47E+07 | 2,32E+08 | -1,143     |
|               | EB ETE 2 | 14 | 1,16E+08 | 1,46E+08 | 7,91E+07 | 1,23E+07 | 2,79E+08 | 0,176      |
|               | ETE 3    | 14 | 1,64E+08 | 1,72E+08 | 4,67E+07 | 9,24E+07 | 2,59E+08 | 0,319      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 3,05E+07 | 2,62E+07 | 1,60E+07 | 8,04E+06 | 6,44E+07 | 0,887      |
| <b>tetA</b>   | ETE 1    | 14 | 1,46E+06 | 1,35E+06 | 4,20E+05 | 9,28E+05 | 2,28E+06 | 0,858      |
|               | EB ETE 2 | 14 | 9,83E+05 | 1,01E+06 | 6,89E+05 | 7,56E+04 | 1,80E+06 | -0,188     |
|               | ETE 3    | 14 | 2,48E+06 | 2,18E+06 | 1,37E+06 | 4,24E+05 | 5,39E+06 | 0,603      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 5,87E+03 | 3,32E+03 | 6,23E+03 | 8,91E+02 | 2,26E+04 | 1,792      |
| <b>blaTEM</b> | ETE 1    | 14 | 4,33E+07 | 4,25E+07 | 1,33E+07 | 2,30E+07 | 6,38E+07 | -0,090     |
|               | EB ETE 2 | 14 | 3,54E+07 | 3,86E+07 | 2,15E+07 | 3,82E+06 | 6,57E+07 | -0,461     |
|               | ETE 3    | 14 | 7,04E+07 | 6,36E+07 | 3,86E+07 | 1,57E+07 | 1,53E+08 | 1,169      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 6,70E+04 | 4,48E+04 | 6,48E+04 | 1,17E+03 | 2,10E+05 | 1,281      |
| <b>ermB</b>   | ETE 1    | 14 | 1,07E+07 | 9,58E+06 | 5,07E+06 | 4,50E+06 | 2,10E+07 | 0,879      |
|               | EB ETE 2 | 14 | 4,71E+06 | 5,29E+06 | 2,87E+06 | 3,72E+05 | 9,21E+06 | -0,165     |
|               | ETE 3    | 14 | 6,07E+07 | 5,44E+07 | 2,17E+07 | 3,25E+07 | 1,08E+08 | 0,809      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 9,76E+04 | 5,97E+04 | 1,03E+05 | 2,64E+03 | 3,36E+05 | 1,438      |
| <b>qnrB</b>   | ETE 1    | 14 | 1,07E+06 | 9,59E+05 | 4,87E+05 | 4,20E+05 | 1,92E+06 | 0,370      |
|               | EB ETE 2 | 14 | 4,75E+05 | 5,61E+05 | 3,54E+05 | 1,58E+04 | 1,07E+06 | 0,003      |
|               | ETE 3    | 14 | 2,14E+06 | 1,78E+06 | 1,52E+06 | 5,09E+05 | 6,00E+06 | 1,513      |
|               | ET ETE 3 | 14 | 3,93E+03 | 1,50E+03 | 7,39E+03 | 2,34E+02 | 2,87E+04 | 3,336      |

**Tabela F2 – Resultados dos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Dunn*, quando aplicável, para as concentrações de GRAs, entre as ETEs estudadas**

| EB ETEs                          | Gene   | Resultado do teste (p: <i>Kruskal-Wallis</i> ) |       | (p: <i>Dunn</i> ) |                  |
|----------------------------------|--------|------------------------------------------------|-------|-------------------|------------------|
| <b>ETE 1<br/>ETE 2<br/>ETE 3</b> | 16S    | Não há diferença significativa.                |       |                   |                  |
|                                  | int1   | Há diferença significativa (p = 0,035)         | ETE 1 | ETE 2             | (p = 0,014)      |
|                                  | sul1   | Há diferença significativa (p = 0,031)         | ETE 1 | ETE 2             | (p = 0,01)       |
|                                  | tetA   | Há diferença significativa (p = 0,001)         | ETE 3 | ETE 1             | (p = 0,032)      |
|                                  |        |                                                |       | ETE 2             | (p = 0,0003)     |
|                                  | blaTEM | Há diferença significativa (p = 0,013)         | ETE 3 | ETE 1             | (p = 0,034)      |
|                                  |        |                                                |       | ETE 2             | (p = 0,005)      |
|                                  |        |                                                | ETE 1 | ETE 2             | (p = 0,034)      |
|                                  | ermB   | Há diferença significativa (p = 0,0000001)     | ETE 1 | ETE 3             | (p = 0,0005)     |
|                                  |        |                                                | ETE 2 | ETE 3             | (p = 0,00000002) |
|                                  | qnrB   | Há diferença significativa (p = 0,00007)       | ETE 2 | ETE 1             | (p = 0,014)      |
|                                  |        |                                                |       | ETE 3             | (p = 0,00001)    |

**Tabela F3 – Estatística descritiva referente à concentração relativa de GRAs (GRAs/RNAr 16S) no EB e ET das ETEs estudadas**

| Gene          | Amostra | <i>n</i> | Média | Mediana  | DP       | Mínimo   | Máximo   | Assimetria |        |
|---------------|---------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|------------|--------|
| <i>int1</i>   | EB      | ETE 1    | 14    | 1,83E-01 | 1,35E-01 | 2,01E-01 | 3,79E-02 | 8,40E-01   | 3,039  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 9,07E-02 | 8,20E-02 | 5,19E-02 | 1,11E-02 | 1,96E-01   | 0,512  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 1,31E-01 | 1,08E-01 | 7,04E-02 | 5,08E-02 | 2,95E-01   | 1,080  |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 3,13E-02 | 2,07E-02 | 2,92E-02 | 5,81E-04 | 8,30E-02   | 0,692  |
| <i>sul1</i>   | EB      | ETE 1    | 14    | 2,58E-01 | 1,53E-01 | 2,92E-01 | 1,02E-01 | 1,18E+00   | 2,844  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 1,90E-01 | 1,70E-01 | 9,93E-02 | 8,43E-02 | 4,70E-01   | 1,846  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 2,15E-01 | 1,79E-01 | 9,45E-02 | 9,87E-02 | 4,58E-01   | 1,313  |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 7,10E-02 | 5,97E-02 | 5,90E-02 | 6,93E-03 | 2,03E-01   | 0,920  |
| <i>tetA</i>   | EB      | ETE 1    | 14    | 2,25E-03 | 1,25E-03 | 2,81E-03 | 6,74E-04 | 1,16E-02   | 3,223  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 1,47E-03 | 1,50E-03 | 6,45E-04 | 6,95E-04 | 2,89E-03   | 0,635  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 3,04E-03 | 2,67E-03 | 1,99E-03 | 1,23E-03 | 9,00E-03   | 2,291  |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 1,68E-05 | 5,30E-06 | 2,57E-05 | 8,52E-07 | 8,73E-05   | 2,143  |
| <i>blaTEM</i> | EB      | ETE 1    | 14    | 6,62E-02 | 3,42E-02 | 7,81E-02 | 1,98E-02 | 2,89E-01   | 2,448  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 6,18E-02 | 5,94E-02 | 3,26E-02 | 1,86E-02 | 1,46E-01   | 1,323  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 8,19E-02 | 8,36E-02 | 2,77E-02 | 3,91E-02 | 1,29E-01   | -0,069 |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 1,89E-04 | 8,54E-05 | 2,67E-04 | 1,64E-06 | 8,63E-04   | 1,927  |
| <i>ermB</i>   | EB      | ETE 1    | 14    | 1,73E-02 | 9,28E-03 | 2,49E-02 | 3,99E-03 | 9,72E-02   | 2,994  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 8,76E-03 | 7,23E-03 | 5,04E-03 | 3,17E-03 | 1,97E-02   | 0,824  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 8,42E-02 | 6,05E-02 | 5,68E-02 | 3,48E-02 | 2,50E-01   | 2,153  |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 2,75E-04 | 1,28E-04 | 3,82E-04 | 5,54E-06 | 1,30E-03   | 1,937  |
| <i>qnrB</i>   | EB      | ETE 1    | 14    | 1,67E-03 | 9,10E-04 | 2,41E-03 | 3,16E-04 | 9,74E-03   | 3,345  |
|               |         | ETE 2    | 14    | 6,82E-04 | 6,52E-04 | 3,43E-04 | 1,43E-04 | 1,51E-03   | 0,839  |
|               |         | ETE 3    | 14    | 2,80E-03 | 1,96E-03 | 2,39E-03 | 7,75E-04 | 1,00E-02   | 2,345  |
|               | ET      | ETE 3    | 14    | 1,23E-05 | 3,03E-06 | 2,92E-05 | 2,11E-07 | 1,11E-04   | 3,420  |

**Tabela F4 – Resultado do teste de *Kruskal-Wallis* para verificar diferenças significativas entre o EB das 3 ETEs (1, 2 e 3) em relação às concentrações relativas das GRAs investigadas ( $\alpha = 0,05$ )**

| EB ETEs                 | Gene          | Resultado do teste (p: <i>Kruskal-Wallis</i> ) |       | (p: <i>Dunn</i> ) |                |
|-------------------------|---------------|------------------------------------------------|-------|-------------------|----------------|
| ETE 1<br>ETE 2<br>ETE 3 | <i>int1</i>   | Não há diferença significativa (p = 0,154)     |       |                   |                |
|                         | <i>sul1</i>   | Não há diferença significativa (p = 0,490)     |       |                   |                |
|                         | <i>tetA</i>   | Há diferença significativa (p = 0,008)         | ETE 1 | ETE 3             | (p = 0,016)    |
|                         |               |                                                | ETE 2 |                   | (p = 0,003)    |
|                         | <i>blaTEM</i> | Há diferença significativa (p = 0,008)         | ETE 1 | ETE 3             | (p = 0,002)    |
|                         |               |                                                | ETE 2 |                   | (p = 0,00008)  |
|                         | <i>ermB</i>   | Há diferença significativa (p = 0,000004)      | ETE 1 | ETE 3             | (p = 0,000004) |
|                         |               |                                                | ETE 2 |                   | (p = 0,000004) |
|                         | <i>qnrB</i>   | Há diferença significativa (p = 0,0001)        | ETE 1 | ETE 3             | (p = 0,013)    |
|                         |               |                                                | ETE 2 |                   | (p = 0,00003)  |

**APÊNDICE G – Resultados dos cálculos de eficiência de remoção (%) e valores de remoção em log medianos para RNAr 16S, *int1* e GRAs na ETE 3**

**Tabela G1 – Eficiência de remoção (%) e valores de remoção em log medianos para RNAr 16S, *int1* e GRAs na ETE 3**

| Gene        | Amostras   | Eficiência de remoção (%) | Log cópias removidos (LCR) |
|-------------|------------|---------------------------|----------------------------|
| RNAr 16S    | 04/11/2021 | -2,23                     | -0,010                     |
|             | 17/11/2021 | 69,87                     | 0,521                      |
|             | 01/12/2021 | 50,89                     | 0,309                      |
|             | 15/12/2021 | 56,66                     | 0,363                      |
|             | 05/01/2022 | 19,51                     | 0,094                      |
|             | 19/01/2022 | 20,82                     | 0,101                      |
|             | 10/02/2022 | 9,48                      | 0,043                      |
|             | 21/02/2022 | 10,77                     | 0,049                      |
|             | 23/03/2022 | -4,51                     | -0,019                     |
|             | 30/03/2022 | 13,22                     | 0,062                      |
|             | 06/04/2022 | -5,40                     | -0,023                     |
|             | 20/04/2022 | -28,34                    | -0,108                     |
|             | 04/05/2022 | 62,55                     | 0,427                      |
|             | 18/05/2022 | 35,47                     | 0,190                      |
| <i>int1</i> | 04/11/2021 | 86,63                     | 0,874                      |
|             | 17/11/2021 | 77,31                     | 0,644                      |
|             | 01/12/2021 | 84,56                     | 0,811                      |
|             | 15/12/2021 | 87,79                     | 0,913                      |
|             | 05/01/2022 | 90,55                     | 1,024                      |
|             | 19/01/2022 | 94,82                     | 1,285                      |
|             | 10/02/2022 | 71,02                     | 0,538                      |
|             | 21/02/2022 | 81,97                     | 0,744                      |
|             | 23/03/2022 | 98,07                     | 1,714                      |
|             | 30/03/2022 | 99,01                     | 2,003                      |
|             | 06/04/2022 | 95,08                     | 1,308                      |
|             | 20/04/2022 | 94,42                     | 1,253                      |
|             | 04/05/2022 | 78,07                     | 0,659                      |
|             | 18/05/2022 | 78,33                     | 0,664                      |
| <i>sul1</i> | 04/11/2021 | 79,35                     | 0,685                      |
|             | 17/11/2021 | 79,68                     | 0,692                      |
|             | 01/12/2021 | 90,25                     | 1,011                      |
|             | 15/12/2021 | 70,77                     | 0,534                      |
|             | 05/01/2022 | 88,95                     | 0,957                      |
|             | 19/01/2022 | 84,27                     | 0,803                      |
|             | 10/02/2022 | 54,22                     | 0,339                      |
|             | 21/02/2022 | 79,35                     | 0,685                      |
|             | 23/03/2022 | 95,81                     | 1,377                      |
|             | 30/03/2022 | 94,30                     | 1,244                      |
|             | 06/04/2022 | 82,20                     | 0,750                      |
|             | 20/04/2022 | 86,07                     | 0,856                      |
|             | 04/05/2022 | 64,43                     | 0,449                      |
|             | 18/05/2022 | 62,85                     | 0,430                      |
| <i>tetA</i> | 04/11/2021 | 99,94                     | 3,207                      |
|             | 17/11/2021 | 99,59                     | 2,386                      |
|             | 01/12/2021 | 99,54                     | 2,339                      |
|             | 15/12/2021 | 99,58                     | 2,376                      |
|             | 05/01/2022 | 99,88                     | 2,937                      |

|               |            |        |       |
|---------------|------------|--------|-------|
|               | 19/01/2022 | 99,97  | 3,526 |
|               | 10/02/2022 | 99,76  | 2,624 |
|               | 21/02/2022 | 99,70  | 2,520 |
|               | 23/03/2022 | 99,90  | 3,012 |
|               | 30/03/2022 | 99,91  | 3,055 |
|               | 06/04/2022 | 99,78  | 2,656 |
|               | 20/04/2022 | 99,96  | 3,399 |
|               | 04/05/2022 | 99,38  | 2,206 |
|               | 18/05/2022 | 99,54  | 2,340 |
| <b>blaTEM</b> | 04/11/2021 | 99,996 | 4,453 |
|               | 17/11/2021 | 99,79  | 2,684 |
|               | 01/12/2021 | 99,92  | 3,088 |
|               | 15/12/2021 | 99,61  | 2,414 |
|               | 05/01/2022 | 99,90  | 3,002 |
|               | 19/01/2022 | 99,998 | 4,718 |
|               | 10/02/2022 | 99,90  | 2,992 |
|               | 21/02/2022 | 99,88  | 2,905 |
|               | 23/03/2022 | 99,95  | 3,319 |
|               | 30/03/2022 | 99,98  | 3,615 |
|               | 06/04/2022 | 99,97  | 3,478 |
|               | 20/04/2022 | 99,97  | 3,536 |
|               | 04/05/2022 | 99,61  | 2,413 |
|               | 18/05/2022 | 99,83  | 2,775 |
| <b>ermB</b>   | 04/11/2021 | 99,98  | 3,717 |
|               | 17/11/2021 | 99,75  | 2,605 |
|               | 01/12/2021 | 99,89  | 2,964 |
|               | 15/12/2021 | 99,38  | 2,208 |
|               | 05/01/2022 | 99,81  | 2,714 |
|               | 19/01/2022 | 99,99  | 4,090 |
|               | 10/02/2022 | 99,92  | 3,103 |
|               | 21/02/2022 | 99,94  | 3,212 |
|               | 23/03/2022 | 99,91  | 3,057 |
|               | 30/03/2022 | 99,95  | 3,316 |
|               | 06/04/2022 | 99,95  | 3,298 |
|               | 20/04/2022 | 99,95  | 3,330 |
|               | 04/05/2022 | 99,42  | 2,238 |
|               | 18/05/2022 | 99,75  | 2,607 |
| <b>qnrB</b>   | 04/11/2021 | 99,97  | 3,556 |
|               | 17/11/2021 | 99,89  | 2,958 |
|               | 01/12/2021 | 99,79  | 2,669 |
|               | 15/12/2021 | 99,52  | 2,320 |
|               | 05/01/2022 | 99,95  | 3,281 |
|               | 19/01/2022 | 99,99  | 3,956 |
|               | 10/02/2022 | 99,95  | 3,274 |
|               | 21/02/2022 | 99,82  | 2,743 |
|               | 23/03/2022 | 99,97  | 3,510 |
|               | 30/03/2022 | 99,78  | 2,654 |
|               | 06/04/2022 | 99,96  | 3,427 |
|               | 20/04/2022 | 99,95  | 3,302 |
|               | 04/05/2022 | 99,42  | 2,234 |
|               | 18/05/2022 | 99,82  | 2,735 |