

Laura Fernandes Braga

Bioprospecção de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano



Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro como pré-requisito para a obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2023

Trabalho a ser realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob orientação da Professora Dra. Joana Montezano Marques e coorientação da Mestre Alana Lais Alves Lima.

CIP - Catalogação na Publicação

F377b Fernandes Braga, Laura
Bioprospecção de enterobactérias com resistência
a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano /
Laura Fernandes Braga. -- Rio de Janeiro, 2023.
60 f.

Orientador: Joana Montezano Marques.
Coorientador: Allana Lais Alves Lima .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. O ecossistema de manguezal . 2. One Health .
3. Impactos de efluentes em mangues urbanos. 4.
Enterobactérias. 5. Resistência a classe de beta
lactâmicos. I. Montezano Marques, Joana , orient.
II. Alves Lima , Allana Lais, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Laura Fernandes Braga

DRE: 120101932

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Andrew Macrae (Presidente)
Prof. Diogo Jurelevicius
Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
Prof. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

**Título da Monografia: “Bioprospecção de enterobactérias resistentes a beta-lactâmicos em
ambiente de manguezal urbano”**

Local: Sala D-27 do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 06 de dezembro de 2023 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota _____ neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, de de 2023.

NOTA:

9,0

9,0

9,0

Banca Examinadora:

Andrew Macrae

Prof. Andrew Macrae (Presidente)

Diogo Jurelevicius

Prof. Diogo Jurelevicius

Ana Maria Mazotto de Almeida

Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida

Prof. Dr. Mateus Gomes de Godoy (Suplente)

Aluno(a):

Laura Fernandes Braga

Orientador(a)

Joana Montezano Marques e Allana Lais Alves Lima

(e coorientador):

Prof. Joana Montezano Marques e Allana Lais Alves Lima

Coordenadora de

TCC:

Prof. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos orixás, entidades amigas e espiritualidade de luz que permearam minha caminhada durante o TCC, me dando forças, confiança e equilíbrio mental nos momentos mais tensos dessa jornada.

Gostaria de dedicar essa obra para minha referência máxima nessa vida, minha mãe. Mommy, se eu estou nessa caminhada, foi porque tive muita inspiração em você. É uma honra ser filha de uma mulher que ama a natureza e a ciência, uma mulher que sempre me incentivou a viver de acordo com o que eu amo e acredito. Seu apoio e carinho foram fundamentais neste momento, não existem palavras que me façam descrever a grandiosidade do meu amor e gratidão por todas nossas vivências, e mais uma vez, vencemos juntas! Eu te amo mais que tudo, sempre juntas.

Agradeço infinitamente ao meu pai, por todo apoio que me deu durante a caminhada da graduação, sempre disponibilizando o melhor para mim, e sempre deixando claro seu orgulho pela filha cientista. Pai, eu que sinto orgulho por ser sua filha. Eu te amo infinitamente, é uma honra poder te admirar não só como pai, mas também como profissional dedicado. Muito obrigada por acreditar em mim e nos meus sonhos.

Minha querida irmã, nossa conexão vai muito além de distâncias em Km. Você é uma inspiração imensa e acho que você nem tem noção disso. É uma honra ser irmã de uma professora e pesquisadora tão competente como você, afinal, não teria graça ser a única irmã inteligente. Muito obrigada por toda ajuda e assistência com este documento, além dos papos aleatórios e fofocas, que me distraem em momentos cansativos. “My love is like a star, you can't always see me, but you know that I'm always there. When you see one shining, take it as mine, and remember I'm always near”. Eu te amo muito mais que o sol.

À minha querida amiga Juliana Braz, eu não tenho como mensurar a gratidão por todo apoio que você me dá há anos. A espiritualidade te colocou em missão na minha vida e já conversamos muito sobre isso. Eu sei que você foi a pessoa escolhida para me guiar até esse curso, até o meu sonho. Desde o ENEM, você não só me incentivou a entrar na Micro, mas também me deu todo suporte e me passou as visões necessárias para sobreviver nesse curso. Esse TCC jamais existiria se não fosse por você, minha cigana. Te amo muito amiga, você é eterna no meu coração.

À minhas queridas companheiras de equipe, minhas joias do Pará, Allana e Rosiane. Eu

jamais acredito em coincidências, e ter vocês ao meu lado durante essa jornada foi um presente da espiritualidade na minha vida. Muito obrigada não só pelas ajudas acadêmicas, mas também por me aguentarem (eu sei que eu não sou fácil rsrs), pela amizade e parceria que desenvolvemos. Trabalhar ao lado de vocês foi o alívio cômico dessa jornada, nossas brincadeiras e descontrações me fizeram sentir em casa. Somos uma família (Alô equipe JMM) muito linda. Amo vocês, minhas irmãs científicas, foi uma honra poder aprender com cada uma das duas. Vocês vão longe e eu vou amar ver cada conquista.

À minha orientadora Joana Montezano Marques, que confiou na menina “doidinha” que gritava chamando-a de maravilhosa pelos corredores do micro. Mal sabia eu que você viria a se tornar minha mãe científica. Muito obrigada não só por me escolher, mas também por confiar em mim um trabalho tão lindo e nobre como este. São raras as pessoas que olham para o lado, para a própria comunidade, e enxergam a ciência. Jô, você é uma mulher, pesquisadora e professora fantástica, não só pela expertise, mas também pelo amor que você põe em todas as coisas. Não sei se posso me chamar de cientista ainda, mas tenha a certeza de que você transformou uma menina “crua” (você sempre usou esse termo com razão), em uma mulher que se sente preparada para enfrentar a vivência científica. Agradeço a cada palavra de incentivo, esporro, brincadeira e momentos de carinho e suporte que vivemos juntas. Minha visão de você é muito, muito além de uma orientadora, e isso se deve por você sempre se mostrar humana. Obrigada por desmistificar muitos estereótipos dentro da nossa área, e me fazer sentir confortável para ser humana também, isso certamente vai refletir na profissional que irei me tornar. Obrigada por confiar que eu seria capaz de concluir esse trabalho, vencemos juntas!

Obrigada ao professor Walter Oelemann, que sempre esteve presente na família JMM, pelo acolhimento e confiança, Ihre Hilfe war sehr wichtig, vielen Dank!

Ao Instituto de Microbiologia e à UFRJ por fornecerem a infraestrutura física para o ensino acadêmico de excelência, os quais foram de suma importância para a realização deste trabalho.

RESUMO

Laura Fernandes Braga

Bioprospecção de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano

Orientador: Joana Montezano Marques

Resumo do Projeto de Monografia apresentado ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Manguezal é um ecossistema localizado entre os ambientes marinho e terrestre, berçário para diversas espécies marinhas. Este possui grande importância ecológica e social, já que várias comunidades ribeirinhas possuem a pesca, principalmente do caranguejo, como fonte de sustento familiar. Os manguezais urbanos recebem grande aporte de poluentes, que podem carrear enterobactérias que apresentam mecanismos de resistência a drogas de importância clínica, como os beta-lactâmicos, sendo considerado problema de saúde pública. Face ao exposto, o estudo possui como objetivo a bioprospecção de enterobactérias resistentes a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano, analisando amostras de água, solo de rizosfera e esgoto. Para tal, foram colhidos em quatro diferentes pontos 1L de água do Rio Jequiá em triplicatas biológicas, P1 (rio canalizado), P2 (primeira aparição do rio com vegetação de mangue), P3 (ambiente de manguezal, próximo à área do viveiro de mudas) e P4 (foz do rio, Baía de Guanabara). Amostradas de solo rizosférico foram coletadas a partir de três plantas na área do viveiro (SR-P3). Ainda nessa mesma área, foram coletadas três amostras de 1L de esgoto urbano de três canos diferentes que desaguavam no solo do mangue (E-P3). A água amostrada apresentou contagem aproximada de 2.5×10^5 NMP de coliformes totais e 1.7×10^5 NMP de coliformes termotolerantes, para os pontos 1, 2, 3 e 4 respectivamente. As contagens de coliformes termotolerantes foram estatisticamente significativas quando P1 e P2 foram comparados a P3 e P4 ($P < 0.05$). As contagens observadas em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona (1,5 µg/ml) foram em torno de 10×10^5 UFC/ml de água para os P1, P2, P3 e P4 e não apresentaram diferença significativa. Quando comparamos as contagens de P3 para água, solo e esgoto, as contagens são de 10×10^7 , também sem diferença estatística ($P < 0.05$). O crescimento observado foi replicado por *replica plating* em ágar MacConkey em diferentes pressões seletivas de beta-lactâmicos: i) sem pressão seletiva, para controle inicial do inóculo; ii) suplementada com Cefoxitina (32 µg/ml; Sigma); iii) Cefepima (16 µg/ml, Sigma); iv) Imipenem (4 µg/ml; Sigma) e v) sem antimicrobianos, para controle final do inóculo. No total foram isoladas 289 colônias, e essas majoritariamente foram isoladas em ambiente de mangue, nas amostras de água P2 e P3. Foi ainda possível isolar colônias resistentes a todos os antibióticos utilizados, em todas as amostras (água, solo e esgoto) e de todos os pontos de amostragem, com exceção de P1 que não apresentou colônias resistentes ao imipenem. Os dados gerados a partir desse estudo podem contribuir para melhor entender a disseminação de resistência antimicrobiana a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal sob forte pressão antrópica e, futuramente, auxiliar na preservação desse ecossistema em áreas urbanas.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Ação Antrópica; Ecossistema Costeiro; Rio Jequiá

ABSTRACT

Laura Fernandes Braga

Bioprospecting for enterobacteria with resistance to beta-lactams in an urban mangrove environment

Orientador: Joana Montezano Marques

Abstract do Projeto de Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Mangrove is an ecosystem located between marine and terrestrial environments, serving as a nursery for various marine species. It holds significant ecological and social importance, as many riverside communities rely on fishing, especially crab fishing, as a source of family sustenance. Urban mangroves receive a significant influx of pollutants, which may carry enterobacteria exhibiting resistance mechanisms to clinically important drugs, such as beta-lactams, posing a public health problem. In light of this, the study aims to prospect enterobacteria resistant to beta-lactams in an urban mangrove environment, analyzing water samples, rhizosphere soil, and sewage. For this purpose, 1L of water was collected at four different points along the Jequiá River in biological triplicates: P1 (channelized river), P2 (first appearance of the river with mangrove vegetation), P3 (mangrove environment, near the seedling nursery area), and P4 (river mouth, Guanabara Bay). Rhizospheric soil samples were collected from three plants in the nursery area (SR-P3). In the same area, three 1L samples of urban sewage from three different pipes draining into the mangrove soil were collected (E-P3).

The sampled water showed an approximate count of 2.5×10^5 MPN of total coliforms and 1.7×10^5 MPN of thermotolerant coliforms for points 1, 2, 3, and 4, respectively. Thermotolerant coliform counts were statistically significant when comparing P1 and P2 to P3 and P4 ($P < 0.05$). Counts observed on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone ($1.5 \mu\text{g/ml}$) were around 10^7 CFU/ml of water for P1, P2, P3, and P4, with no significant difference. When comparing counts from P3 for water, soil, and sewage, the counts were 10^7 , also without statistical difference ($P < 0.05$). The observed growth was replicated by replica plating on MacConkey agar under different beta-lactam selective pressures: i) without selective pressure for the initial inoculum control; ii) supplemented with Cefoxitin ($32 \mu\text{g/ml}$; Sigma); iii) Cefepime ($16 \mu\text{g/ml}$, Sigma); iv) Imipenem ($4 \mu\text{g/ml}$; Sigma); and v) without antimicrobials for the final inoculum control. A total of 289 colonies were isolated, predominantly in the mangrove environment, in water samples P2 and P3. It was also possible to isolate colonies resistant to all antibiotics used in all samples (water, soil, and sewage) and from all sampling points, except for P1, which did not show colonies resistant to imipenem. The data generated from this study can contribute to a better understanding the spread of antimicrobial resistance to beta-lactams in a mangrove environment under strong human pressure and, in the future, help preserve this ecosystem in urban areas.

Key words: Antimicrobial, Anthropic Pressure, Coast Environment, Jequiá River

RESUMO PARA LEIGOS

Superbactérias podem habitar não só nosso corpo, mas também ecossistemas próximos a nós?!

Ao observarmos um rio que atravessa áreas urbanas, supomos que suas águas estejam sujas, certo? Mas o quanto essa sujeira pode resultar em problemas em nossa saúde e no meio ambiente?

Superbactérias são bactérias mais fortes que os remédios que tomamos para tirá-las do nosso corpo! E quando isso acontece, dizemos que elas apresentam resistência!

Essas superbactérias podem morar no nosso intestino, enquanto nos deixam doentes! E elas são liberadas muitas vezes, quando vamos ao banheiro. A partir desse conhecimento, podemos dizer que o esgoto também pode ser a casa dessas superbactérias, certo!?

Infelizmente, é comum vermos esgotos a céu aberto, sendo despejados no meio ambiente, como em rios e praias. Áreas de manguezais não ficam de fora dessa! O que se torna um problema ainda mais sério quando esses manguezais estão localizados próximos a centros urbanos. Isso é ruim não apenas pela perda da qualidade da água de rios e mangues, mas também pelo risco à saúde de moradores que vivem próximos a essas regiões. A pesquisa então, teve como objetivo identificar bactérias resistentes nas águas, e entender como essa resistência se espalha pelo ambiente de manguezal urbano.

Para que pudéssemos observar a presença destas bactérias, foram pegadas amostras de água de um rio que corta um ambiente de manguezal urbano. No laboratório essas amostras passaram por um filtro e foram colocadas em meios de cultura, que são como alimentos para estas bactérias! Depois, foram testadas se estas bactérias conseguiriam crescer nestes meios de cultura contendo agora medicamentos que são usados normalmente em hospitais para cuidar dos doentes. Lembra da resistência? Então, queremos entender se essa está acontecendo ou não. Foram encontradas em altas quantidades as bactérias que vêm das fezes (podendo ser principalmente humana). Infelizmente, a resistência que estávamos procurando apareceu! A água do mangue, o solo e o próprio esgoto das casas, apresentavam as superbactérias.

O estudo pode auxiliar a entender como a resistência está se fazendo presentes em ambiente de manguezal urbano, pois queremos ajudar na segurança das comunidades ribeirinhas ao entorno do mangue, e ser inspiração para futuros projetos que também querem ajudar na preservação de manguezais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das principais feições do manguezal. Em ordem ascendente (da região alagada para a região seca) têm-se: feição lavado; feição bosque de mangue; feição apicum	2
Figura 2 - Características observadas nos diferentes tipos de mangue: a) mangue vermelho (<i>Rhizophora mangle</i>); b) mangue branco (<i>Laguncularia racemosa</i>); c) mangue preto (<i>Avicennia schaueriana</i>)	3
Figura 3 – Representação esquemática da interação microrganismo-plantas em ambiente de manguezal exemplificando suas diversas funções na ciclagem biogeoquímica de elementos essenciais, degradação de matéria orgânica e produtos gerados a partir de atividades antrópicas (ex. PAH, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos)	6
Figura 4 - Mapeamento da distribuição de manguezais no Estado do Rio de Janeiro	8
Figura 5 - Área de estudo e demarcação dos pontos de coleta ao longo do Rio Jequiá, identificados no mapa através de marcação circular em cores correspondendo às coordenadas geográficas: Ponto 1 (P1 - roxo 22°48'43" SE); Ponto 2 (P2 - amarelo 22°49'18" S); Ponto 3 (P3 - cinza 22°49'21" SE) e; Ponto 4 (P4 — vermelho 22°49'31" O)	18
Figura 6 - Pontos de coleta em representação fotográfica do curso do Rio Jequiá desde sua primeira aparição (rio canalizado, P1 – A), ao longo do ecossistema de manguezal (P2 e P3, em B e C, respectivamente) e em sua foz na Baía de Guanabara (P4 – D)	19
Figura 7 - Esquema representativo da coleta de solo rizosférico das plantas de mangue vermelho (<i>Rhizophora mangle</i>) correspondente ao ambiente de P3	20
Figura 8 - Esquema representativo dos canos de coleta de esgoto correspondente ao ambiente de P3	21
Figura 9 - Esquema de realização da técnica de replica plating	24
Figura 10 - Esquema resumido da metodologia utilizada para a obtenção das estirpescepas bacterianas nas amostras de água fluvial, solo rizosférico e esgoto doméstico com resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados	24

Figura 11- Representação gráfica do número mais provável de coliformes termotolerantes (NMP de células/ml) presentes em cada ponto de coleta (P1, P2, P3 e P4) das amostras de água fluvial. A presença de letras diferentes acima das colunas do gráfico indica diferença estatisticamente significativa entre as contagens ($p > 0.05$, teste de Tukey)

..... 25

Figura 12- Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) isoladas em cada ponto de coleta (P1, P2, P3 e P4) das amostras de água fluvial que apresentaram resistência à antimicrobiano beta-lactâmico Ceftriaxona (CRO). Não foi indicada diferença estatisticamente significativa entre as contagens ($p > 0.05$, teste de Tukey):

.....27

Figura 13- Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ml) das bactérias isoladas dos diferentes pontos de água (P3), solo de rizosfera (SRP3) e esgoto doméstico (EP3) que apresentam resistência à ceftriaxona.....28

Figura 14- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) referente ao total das cepasestirpes bacterianas isoladas em cada amostragem realizada no estudo (água fluvial, solo de rizosfera e esgoto doméstico)

Figura..... 29

Figura 15- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) das estirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta (P1, P2, P3, P4) das amostras de água fluvial, solo rizosférico (SRP3) e esgoto doméstico (EP3) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Cefoxitina - FOX, Cefepime - CPM e Imipenem - IMP)

..... 29

Figura 16- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) referente ao total das cepasestirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta de água do Rio Jequiá (P1, P2, P3, P4) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados.....30

Figura 17- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) das estirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta (P1 - A, P2 - B, P3 - C e P4 - D) das amostras de água fluvial, solo rizosférico (SRP3 - E) e esgoto doméstico (EP3 - F) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Cefoxitina - FOX, Cefepime - CPM e Imipenem - IMP)

.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de classificação dos antimicrobianos escolhidos para o trabalho (Cefoxitina -FOX, Cefepime - CPM e Imipenem - IMP). Os classificando quanto às suas estruturas, classe, classificação e geração	12
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius
ATM - antimicrobiano
BHI - do inglês “*Brain Heart Infusion*”
CPM - Cefepime
CRO - Ceftriaxona
DNA - do inglês “*Desoxyribonucleic acid*”
DTHA - doenças de transmissão hídrica e alimentar
ECA - antígeno comum a enterobactérias
FOX - Cefoxitina
IMP - Imipenem
KPC - *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase
LSPN - Lista de nomes procarióticos com posição na nomenclatura
mL - mililitro
PBPs -proteínas de ligação à penicilina
Ph - potencial hidrogeniônico
PTN - proteína
RNA - do inglês “*Ribonucleic acid*”
THG - transmissão horizontal de genes
µl - microlitros
µlg - microgramas

INDICE

I. Introdução.....	1
1.1 O ecossistema de manguezal	2
1.2 A flora do manguezal.....	3
1.3 A fauna do manguezal	4
1.4 Microbiota do manguezal	5
1.5 Importância ecológica.....	7
1.6 Manguezais do Rio de Janeiro.....	8
1.7 Impactos de efluentes em mangues urbanos.....	9
1.8 Enterobactérias	10
1.9 Resistência a classe de beta-lactâmicos.....	11
1.10 O conceito de saúde única (<i>One Health</i>)	13
II. Justificativa e contextualização.....	15
III. Objetivo.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
IV. Material e métodos.....	18
4.1 Área de estudo.....	18
4.2 Número mais provável de coliformes.....	21
4.3 Isolamento e contagem.....	22
4.4 Isolamento de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos.....	23
V. Resultados	25
5.1 Número mais provável de coliformes.....	25
5.2 Contagem de enterobactérias resistentes a Ceftriaxona.....	28
5.3 Isolamento de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos.....	31
VI. Discussão.....	33
VII. Conclusão.....	38
VIII. Referências bibliográficas.....	39

I. Introdução

1.1 O ecossistema de manguezal

O manguezal é um ecossistema costeiro presente em regiões tropicais e subtropicais, as quais apresentam elevadas temperaturas médias anuais. No Brasil, esse ecossistema ocorre em cerca de 1 milhão de hectares, revestindo 30% da costa brasileira (ICMBio, 2018). A floresta associada a este ecossistema se localiza na transição do ambiente terrestre para o marinho, em regiões estuarinas, as quais há o desague de rio no mar, caracterizando as águas presentes no mangue, como salobras (Santos *et al.*, 2012).

Este bioma costeiro apresenta características físicas, químicas e biológicas bem demarcadas. Um exemplo disso é o solo do mangue, que é diretamente influenciado pela salinidade presente em águas marinhas, o que o caracteriza como holomórfico. A composição deste solo se dá pela associação de sedimentos de origem marinha e fluvial, munidos de matéria orgânica, e ocorrem nas áreas costeiras de topografia plana, sendo constantemente influenciados pelas marés (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2015). A interação de águas fluviomarinhas gera o acúmulo de detritos orgânicos de diferentes procedências nesse solo, principalmente em condições de baixa de marés, agregando na riqueza de matéria orgânica no ambiente de manguezal. Em razão do aporte de salinidade oriundo das águas marinhas, a significativa concentração salina caracteriza as águas presentes no mangue, como salobras (Embrapa, 2021).

As variações de marés possuem também uma importante influência na dinâmica das distribuições de vegetação ao longo do ecossistema. A salinidade das águas marinhas ocasiona o aumento da concentração salina do solo. Este fato ocorre, pois, pelas oscilações de inundações, de acordo com a distância do canal d'água, juntamente com a diferença de umidade, que varia também em razão do afastamento da região alagada. (Santos, 2005). Em consequência desses fatores, o manguezal é dividido em diferentes feições, as quais são denominadas: i. feição lavado; ii. bosque de mangue e, iii. apicum, representados na Figura 1.

A feição lavada é a que possui maior interação com inundações, possuindo solo lamoso ou areno-lamoso, sendo este desprovido de cobertura vegetal. Em contrapartida, a feição de bosque de mangue possui uma ampla e diversa cobertura vegetal vascularizada. A feição apicum é considerada a mais interna do manguezal, sendo diretamente atingida

pelas águas salobras que compõem o canal de mangue. Uma peculiaridade desta feição é sua capacidade de propiciar a colonização da flora do bosque de mangue, em razão de características físico-químicas que se acometem em razão do acúmulo de matéria orgânica, juntamente com as variações de marés (Schaeffer-Novelli et al. 2015).

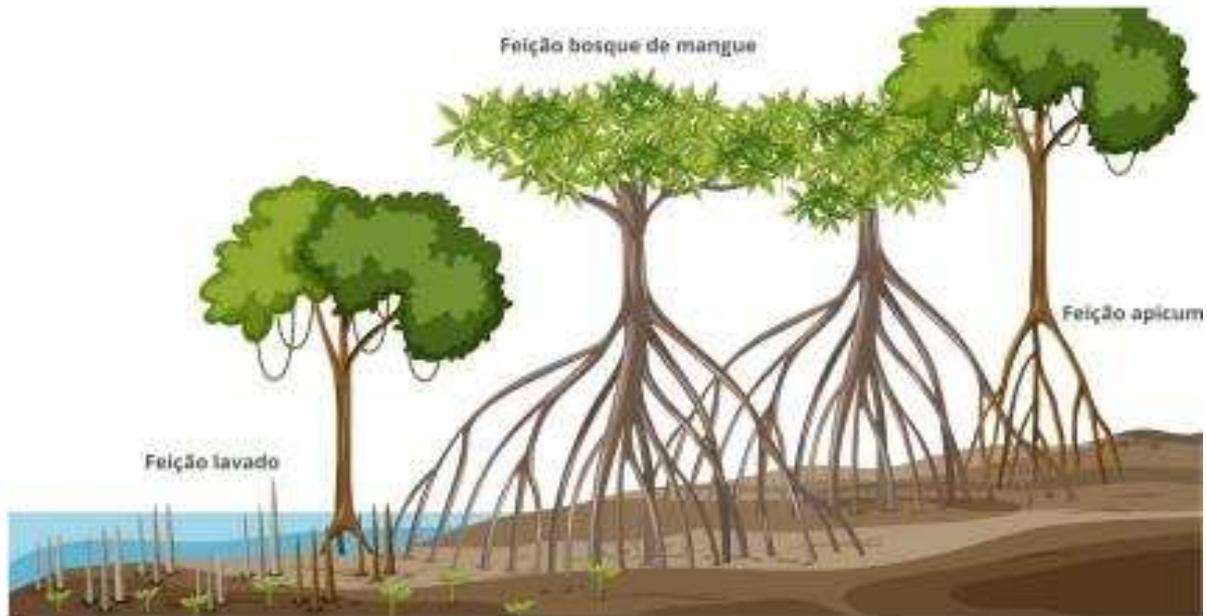


Figura 1 - Esquema representativo das principais feições do manguezal. Em ordem ascendente (da região alagada para a região seca) têm-se: feição lavado; feição bosque de mangue; feição apicum. **Fonte:** Acervo pessoal.

1.2 A flora do manguezal

Apesar da presença de nutrientes oriundos de material orgânico acumulado no solo, o manguezal é um ecossistema com características que tornam difícil o desenvolvimento da vegetação presente nesse ecossistema. Este fato se dá pela pobreza de oxigênio e alta salinidade nas águas que interagem com as raízes que necessitam da presença de oxigênio para a realização das trocas gasosas e seu desenvolvimento (Schaeffer-Novelli et al., 2004).

A floresta de mangue é caracterizada pela presença de árvores que apresentam padrões fisiológicos para sobreviverem em ambientes salinos, inundados e com baixo teor de oxigênio. As espécies de mangue mais comuns no Brasil são o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) e o mangue preto (*Avicennia schaueriana*) e estão representadas na Figura 2. Mais perto da água e de solos menos compactos, tem-se a ocorrência do mangue-vermelho. Na região que é inundada por

curtos períodos, apenas nas altas marés, observa-se a predominância do mangue-branco. Mais perto da água e de solos menos compactos, tem-se a ocorrência do mangue-vermelho. Adentrando o ambiente de manguezal, encontra-se o mangue-preto, porção a qual se encontra mais distante do canal do mangue, sofrendo menos influência nos períodos de inundação (ICMBio, 2018).

O mangue vermelho é uma espécie característica dos manguezais, com raízes escoras em forma de grandes arcos que saem do caule sustentando a planta no substrato lodoso, e promovendo trocas gasosas com a atmosfera. Além disso, as suas folhas possuem propágulos que se movem de acordo com o regime das marés e que podem tanto manter-se flutuando até o momento que se fixa ao solo, ou podem germinar ainda quando estão vinculadas à planta mãe, o que facilita a reprodução por viviparidade, característica da espécie (ICMBio, 2018).



Figura 2- Características observadas nos diferentes tipos de mangue: a) mangue vermelho (*Rhizophora mangle*); b) mangue branco (*Laguncularia racemosa*); c) mangue preto (*Avicennia schaueriana*). **Fonte:** Acervo pessoal.

O mangue branco (*Laguncularia racemosa*) é uma espécie da família Combretaceae. Sua reprodução é por sementes e os propágulos presentes na espécie se fixam ao solo, induzindo a germinação de novas árvores. Essa espécie se encontra principalmente nas áreas um pouco mais afastadas, em sucessão ao mangue vermelho, para receber uma menor

influência da oscilação das marés, isto é, precisam de um período sem inundação, para garantir o processo de enraizamento no substrato. As folhas do mangue **branco** são arredondadas, e seu sistema radicular possui pneumatóforos menores e que podem ser bifurcados ou trifurcados (Schaeffer-Novelli *et al.*, 1990).

Conhecido como mangue seriba ou mangue preto, *Avicennia schaueriana* é uma espécie arbórea constituinte do mangue, que possui características particulares em seu desenvolvimento, como caule de cor castanho-claro, escamas abaixo das folhas com coloração esbranquiçada e sistema radicular composto por inúmeros pneumatóforos. Suas raízes horizontais ficam próximas à superfície do solo, enquanto as raízes axiais possuem ramificações expostas ao ar e eretas ao redor do tronco. Para o seu melhor desenvolvimento, necessita de áreas que sofrem menos com inundações periódicas, ou seja, são predominantes em zonas afastadas da influência das marés (Fernandes, 2003).

1.3 A fauna do manguezal

A vida no ambiente de mangue não se limita apenas a sua floresta, mas também a diversidade de classes animais que estão presentes nesse ecossistema. As espécies que apresentam quaisquer ciclos de vida no ambiente de mangue possuem adaptações às condições adversas desse ambiente. Entre os animais associados ao manguezal, pode-se citar os crustáceos decápodes, como camarões e caranguejos, moluscos bivalves e gastrópodes, diversas espécies de peixes, além de uma variedade de organismos planctônicos. Também se tem a presença de mamíferos aquáticos, como peixe-boi e dugongos que podem compor esse ecossistema, assim como animais terrestres e semi-terrestres, como jacarés, cobras e iguanas (Souza, 2018).

Entre os animais que habitam o manguezal, destacam-se os caranguejos. Esses possuem uma vasta diversidade de espécies, sendo uma importante referência de fauna nos solos lodosos. Esses animais realizam um importante trabalho de movimentação constante do sedimento do manguezal, construindo galerias e levando para a superfície parte dos sedimentos ricos em nutrientes que serão transportados pelas águas do estuário próximo à alta de maré. Uma grande diversidade de peixes adentra os manguezais também na maré alta, muitas vezes dependendo das fontes alimentares do manguezal, pelo menos na fase juvenil. Já nos troncos submersos, animais filtradores como ostras se alimentam de partículas suspensas na água, enquanto os moluscos se alimentam durante a maré alta. As aves comedoras de peixes e de invertebrados marinhos nidificam nas árvores do manguezal

e se alimentam especialmente na maré baixa, quando os fundos lodosos se encontram não inundados e estão acessíveis para a predação (Souza *et al.*, 2018).

1.4 Microbiota do manguezal

O manguezal possui características físico-químicas e biológicas bem particulares. Conseqüentemente todos os organismos que contidos nesse ecossistema são diretamente influenciados por propriedades como salinidade, pH e nutrientes disponíveis, e baixa tensão de oxigênio em seus sedimentos (Liang *et al.*, 2023). Sob a ótica da microbiologia, esta influência se dá, primeiramente, na modulação das diferentes comunidades microbianas que se desenvolvem no ambiente, como no tipo de metabolismo e nas diferentes funções destes microrganismos no ecossistema, que desempenham atividades importantes para a ecologia e equilíbrio desse ambiente. Ademais, os variados gradientes de concentração salina ao decorrer do mangue influenciam também na distribuição de diferentes gêneros e espécies (Abdu *et al.*, 2017). Dentre os microrganismos que compõem o manguezal, há um destaque para os principais filos do domínio Bacteria, como Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes e Cyanobacterias. Já dentro do domínio Eukarya, os fungos ganham destaque também nesse ambiente (Borrego *et al.*, 2023).

Existe uma relação entre os microrganismos e as plantas no ambiente de manguezal, e essa interação possui um importante papel na manutenção do ecossistema. Essa simbiose entre os organismos ocorre por meio de exsudatos secretados pelas plantas, também por metabólitos secundários secretados pelos microrganismos. Bem como a interação entre os compostos originários das plantas e dos microrganismos. Alguns dos principais filos bacterianos possuem participação em importantes etapas nas ciclagens biogeoquímicas, como nos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo (Liang *et al.*, 2023), como demonstrado na Figura 3.

Os fungos são geralmente seres heterotróficos, os quais desenvolvem-se majestosamente em ambientes ricos em matéria orgânica, que é o caso de biomas costeiros, como o manguezal. Por possuírem uma vasta gama de enzimas, são capazes de degradar compostos orgânicos considerados complexos. Os fungos possuem suma importância como decompositores no ambiente que se inserem, sendo responsáveis pelo consumo da matéria orgânica disponível, a utilizando como fonte de obtenção de energia e, conseqüentemente, contribuindo na ciclagem biogeoquímica, juntamente com as bactérias e plantas. Com isto, fungos também atuam em contaminantes ambientais, que carregam

consegue componentes tóxicos ao ecossistema, pelo indevido despejo no mar. Sendo esses capazes de hidrolisar compostos nocivos ao ambiente, como xenobiontes e metais pesados (Jia *et al.*, 2020).

Os microrganismos não apenas possuem funções dentro da ecologia do manguezal, mas também em sua preservação. Por exemplo, um importante contaminante no canal d'água e dos solos de manguezal, é o petróleo, e a presença deste óleo acarreta perdas de integridade físico-química do ambiente, além de prejudicar a biodiversidade que o compõe. Entretanto, diferentes filos bacterianos possuem capacidade de degradar compostos orgânicos tóxicos ao ambiente. Enfoque no gênero *Pseudomonas*, este possui espécies com capacidades degradadoras de compostos orgânicos alcanos que degradam hidrocarbonetos, se mostrando uma interessante via para a remediação destas contaminações (Palleroni, Pieper & Moore, 2010; Chadhain *et al.*, 2018).

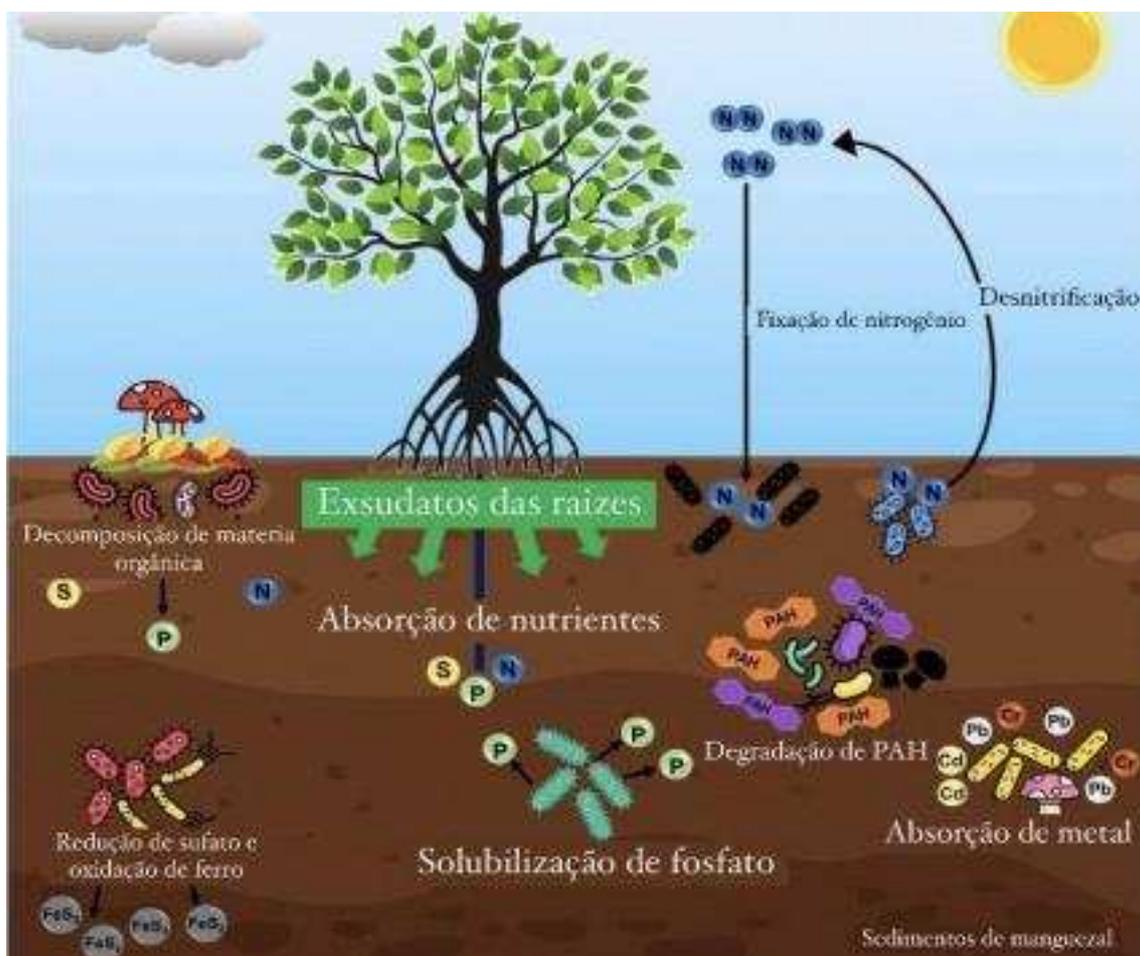


Figura 3 – Representação esquemática da interação microrganismo-planta em ambiente de manguezal exemplificando suas diversas funções na ciclagem biogeoquímica de elementos

essenciais, degradação de matéria orgânica e produtos gerados a partir de atividades antrópicas (ex. PAH, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos). **Fonte:** Adaptado de Palit *et al.*, 2022.

1.5 Importância ecológica

O manguezal possui diversas características importantes para a ecologia, assim como para o setor econômico (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2015). Do ponto de vista ecológico, os manguezais são ecossistemas que apresentam diversas particularidades que contribuem positivamente para o meio ambiente, por começar em sua capacidade de sequestro de carbono, que é comparável à de outras florestas tropicais úmidas. Ademais, desempenham um papel de barreiras físicas nas Zonas Costeiras, evitando que a área sofra com a ação de mudanças climáticas, como tempestades e/ou quaisquer eventos extremos que gere uma situação de vulnerabilidade à costa. A citada proteção física das Costas ocorre em razão do acúmulo de sedimentos ao percorrer do bosque de mangue, que ocasiona um nivelamento de seu solo de acordo com as altas de marés, compensando parcialmente o aumento do nível do mar, evitando inundações. Este ecossistema é considerado também um filtro natural para rejeitos grosseiros que teriam como destino o deságue no mar (ICMBio, 2018).

O manguezal é também utilizado como berçário para diferentes classes e espécies de animais, este fato se dá pela abundância de nutrientes presentes em suas raízes, junto a variações de marés, que torna o ambiente favorável para a reprodução e desenvolvimento dos animais. Ademais, algumas espécies de animais que possuem sua reprodução em ambientes marinhos, migram para o mangue a fim de se alimentarem e se desenvolverem, antes de retornar ao mar (Rebob, 2022).

Do ponto de vista econômico, um setor beneficiado é o da pesca, uma vez que os manguezais servem como berçários naturais para diferentes espécies de peixes, crustáceos e moluscos. Alguns dos animais pescados no mangue possuem um alto interesse comercial, apreciados como iguaria. Por exemplo, o caranguejo uçá, que possui comunidades pesqueiras apenas desta espécie, em razão da grande busca comercial (Alves e Nishida, 2002). Visto que a atividade pesqueira possui uma grande demanda de vendas, esta é uma importante fonte de sustento das comunidades ribeirinhas, que possuem como seu sustento direto, a venda dos pescados. O ecoturismo também é uma fonte econômica relacionada aos manguezais, como passeios de canoa pelos córregos dos rios e trilhas no entorno da floresta de mangue são atividades que atraem turistas para a região (Souza *et al.*, 2018).

1.6 Manguezais do Rio de Janeiro

Apesar das perdas desse ecossistema que ocorrem no território nacional, o Estado do Rio de Janeiro completou uma década sem perdas da vegetação de mangue (SOS Mata Atlântica, 2021). O Rio de Janeiro é o estado da região sudeste de maior extensão de mangue. Dos manguezais presentes no estado, o da Baía de Guanabara é o maior em extensão. Este é localizado na cidade do Rio de Janeiro, tendo sua extensão compreendendo mais da metade do total de quilometragem dos manguezais fluminenses, com um total de 74 quilômetros quadrados (ICMBio, 2018). A Figura 4 mostra a ocorrência de manguezal pelo território do Estado do Rio de Janeiro.

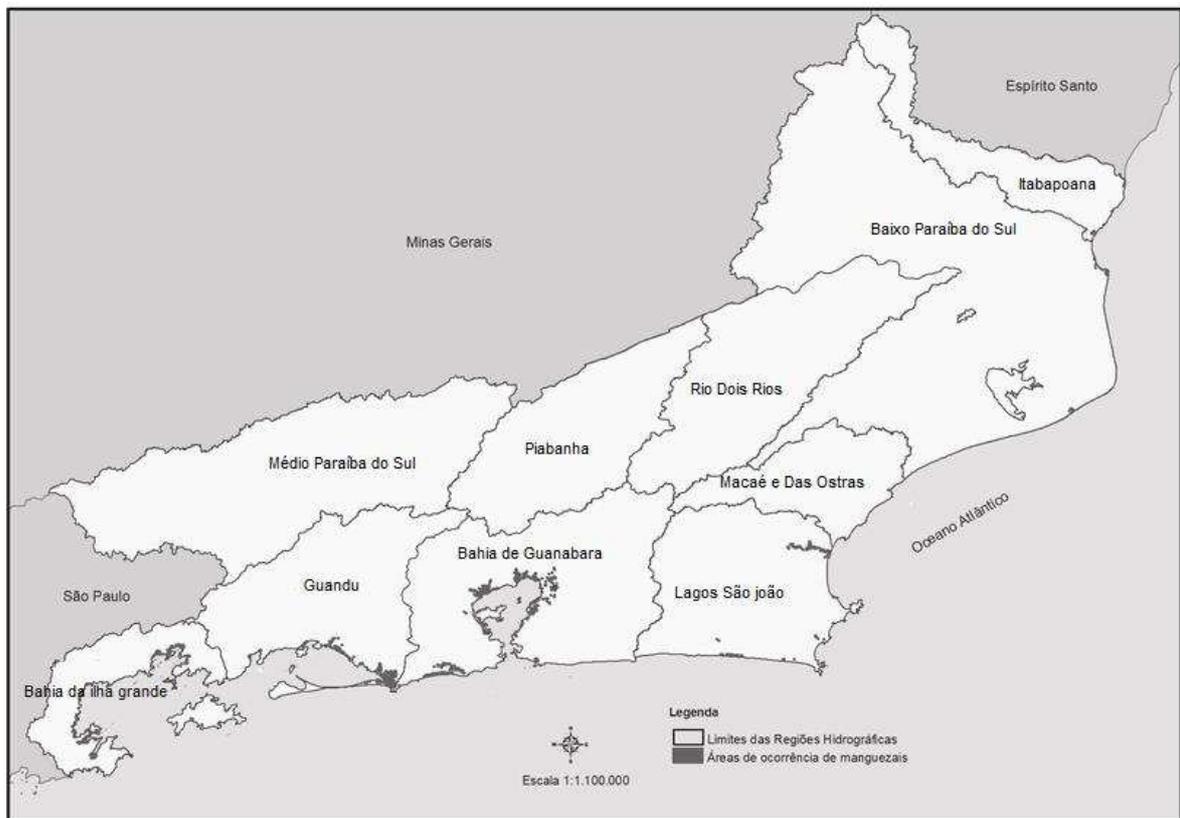


Figura 4- Mapeamento da distribuição de manguezais no Estado do Rio de Janeiro. **Fonte:** Adaptado de Embrapa, 2013.

Mesmo possuindo uma extensa área de vegetação, há a necessidade de um maior mapeamento da incidência de manguezais no estado do Rio de Janeiro, bem como as descrições detalhadas sobre dimensão, localizações, condições físicas destes ecossistemas, e suas pressões antrópicas (Embrapa, 2013). Porém, na cidade do Rio de Janeiro, se tem a incidência de florestas de mangue em grande parte das regiões, como na Norte, com a Baía

de Guanabara, na Oeste, nas regiões de Guaratiba/Sepetiba e na chamada Baixada Fluminense, como a cidade de Duque de Caxias, que possui florestas de mangue com deságue na baía de Guanabara (ICMBio, 2018).

A região central da cidade do Rio de Janeiro possuía mangue em sua geografia original, porém, na época do reinado de Dom João VI, houve o aterramento do manguezal, e atualmente é uma região totalmente urbanizada, e o córrego associado ao manguezal original atravessa a cidade como um canal de efluente (Fajardo, 2016). Mesmo que muitos manguezais mais próximos a cidade, ou até mesmo inseridos dentro do espaço urbano, continuem com suas dimensões geográficas intactas, estes possuem uma vulnerabilidade maior quanto a ações antrópicas em seu bioma.

1.7 Impactos de efluentes em mangues urbanos

Com o crescimento urbano desordenado e com a expansão territorial constante e sem o devido planejamento sanitário, as áreas de manguezais situadas na cidade sofreram sérias consequências pela ação antrópica (Varela, 2020). Sobretudo, prejuízos com o equilíbrio da sua integridade original, incluindo a perda de habitat, a alteração da qualidade da água, a degradação do solo e contaminação por dejetos humanos (ICMBio, 2018).

Com enfoque no aporte de poluentes que se integram nas águas do mangue, todo o resíduo da cidade, que não é coletado e tratado, tem como destino os rios e mares, sendo que parte disso se deposita nos manguezais. Estes contaminantes possuem diferentes origens, como efluentes industriais, hospitalares e, até mesmo, de origem doméstica (Soffiati, 2006). Apesar de haver leis de proteção aos manguezais inseridos nas cidades, há a contínua contaminação deste ecossistema (PNSB, 2018). Fatalmente, o descuido com o ecossistema em área urbana afeta diretamente a comunidade que vive ao redor dele, e, com uma análise mais minuciosa, os impactos antrópicos no ambiente de mangue também podem influenciar nas regiões mais afastadas do bioma costeiro.

O manguezal já foi associado à insalubridade e pobreza, devido ao seu característico forte odor, dificuldades de acesso e trânsito, e por ser moradia de pessoas menos favorecidas. Esses fatores resultaram na negligência desse ecossistema pela comunidade científica e poder público no século XX, os quais julgavam florestas como a Amazônica e a Atlântica como superiores em relação a florestas de menor porte, como o mangue, por exemplo (Soffiati, 2006). Em razão da ausência de infraestrutura e assistência adequada para a comunidade residente do mangue, a falta de serviços básicos, como abastecimento

de água, saneamento básico e energia elétrica, impõe uma série de desafios e limitação à qualidade de vida dos moradores. Um importante fator prejudicial para os ribeirinhos também é o fato que seus esgotos domésticos são desprezados no solo e água do mangue (Moura, 2018). A presença de efluentes expõe a comunidade a uma gama de microrganismos que possuem ampla importância clínica, como por exemplo, o grupo dos coliformes.

1.8 Enterobactérias

Pertencentes à família Enterobacteriaceae, as enterobactérias são um amplo grupo que possui mais de 40 gêneros documentados (acesso ao LPSN [*List of Prokariots*] em novembro de 2023). São bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, não esporulados, que em sua maioria possuem estruturas associadas à motilidade, são fermentadoras de glicose e oxidase negativas (Brenner, 2015).

O sequenciamento do gene que codifica o RNAr 16S para análise a nível taxonômico, associada a hibridização DNA-DNA viabiliza o reconhecimento de novas espécies da família. Um marcador fortemente associado a Enterobacteriaceae é uma fração de carboidrato de funcionalidade associado à barreira de permeabilidade de membrana, chamado Antígeno Enterobacteriano Comum (ECA). A presença deste é quase exclusiva do grupo, sendo um critério para associar uma bactéria como pertencente à família (Holst, 2007).

Em termos de identificação um grande avanço para rápida e eficiente detecção de patógenos presentes em uma determinada amostra pode ser o uso de técnicas proteômicas, aplicando-se a espectrometria de massa, para identificação de microrganismos. Esta técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo - TOF (Time-of-Flight), torna possível a comparação do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de estirpes conhecidas, possibilitando a classificação e identificação dos patógenos (Angeletti 2015).

As enterobactérias estão amplamente distribuídas pelo mundo todo, podendo ser encontradas no meio ambiente, envolvidas em funções no ambiente que se inserem, como em solos e plantas. Essas também podem ser encontradas associadas a plantas como

fitopatogénico, ou em matrizes alimentares, como contaminantes de origem fecal-oral (Janda e Abbott, 2021). Apesar de fazer parte da microbiota intestinal de seres humanos, esta família é considerada o grupo de bactérias mais associado à hospitalização de humanos (Brenner, 2015; Donaldson *et al.*, 2016). Essas bactérias são responsáveis por diversos tipos de infecções, variando desde garganta, bexiga, até vias sanguíneas e sistema nervoso central, como é o caso da meningite. Está presente também em infecções nosocomiais, zoonoses, surtos esporádicos e num contexto histórico, até pandemias (Janda e Abbott, 2021). Ademais, essa família é responsável por uma das maiores mortalidades a nível mundial, que é a diarreia infecciosa (Chlebicz e Slizewska, 2018).

Uma importante classificação de enterobactérias associadas a contaminações referentes a efluentes, é o grupo dos coliformes. Por definição, são um grupo de bactérias composto pelos gêneros bacterianos *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*. São bacilos anaeróbios facultativos, Gram-negativos, não esporulados e fermentadores de lactose. Existe uma separação entre coliformes totais e termotolerantes, e a diferença está na capacidade de fermentação de lactose em um amplo espectro de temperatura ($44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) (Food Safety Brazil, 2018)

E. coli é um patógeno associado a doenças alimentares, uma vez que é produtora de enterotoxinas. No ambiente aquático, a presença de *E. coli* é indicador de contaminação de efluentes. Enfatizando a ligação entre a presença no intestino humano e em águas de rios/mares, que provém de esgoto de origem doméstica e/ou hospitalar naquele ambiente (U.S Food and Drug Administration, 2020).

A pesquisa de coliformes termotolerantes é de suma importância para entender além da presença de *E. coli* no ambiente, pois junto com esse dado, se pressupõe que existam outros gêneros bacterianos patogênicos, também pertencentes à família Enterobacteriaceae no mesmo ambiente de amostragem (Bitton, 2005). Dado ao conhecimento dos variados casos clínicos associados a enterobactérias, a necessidade de tratamento para as patologias impulsionou a pesquisa por drogas contra essas bactérias.

estirpes

1.9. Resistência à classe dos beta-lactâmicos

A resistência à classe de antibióticos beta-lactâmicos possui origem natural, oriunda de uma possível autopreservação de bactérias frente à interação com compostos munidos de anel lactâmico. Uma evidência desse mecanismo ser desenvolvido por questões de

sobrevivência, se demonstra pela homologia das betalactamases com Proteínas de Ligação à Penicilina (PBPs), sendo estas, suas possíveis ancestrais (Bush, 2018).

Entretanto, atualmente, a emergência de genes de resistência a diferentes grupos de beta-lactâmicos, incluindo os quimioterápicos de gerações mais recentes, apresentam um risco para a saúde global, pois infecções bacterianas são a principal causa de internações clínicas. Além dos impactos na saúde, o setor econômico também se mostra vulnerável à questão da resistência devido à incessante demanda por novos fármacos, que se provêm eficientes frente às bactérias resistentes.

Há uma discussão sobre os prejuízos financeiros que se agravaram em razão da crescente disseminação desses genes em diferentes instâncias, como em ambientes hospitalares, na sociedade, e até mesmo nos ambientes naturais, como ecossistemas (Zhuang *et al.*, 2021).

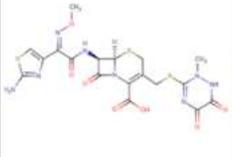
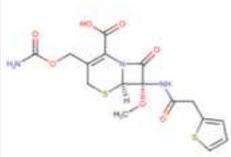
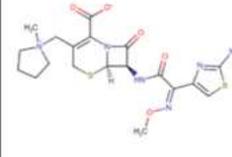
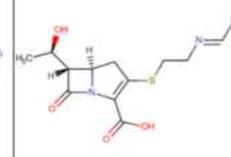
Antimicrobianos	Ceftriaxona	Cefoxitina	Cefepime	Imipenem
Classificação	Cefalosporina	Cefalosporina	Carbapenemico	Carbapenemico
Geração	3º geração	2º geração	4º geração	1º geração
Betalactamase	ESBL e AmpC	ESBL e AmpC	ESBL e AmpC	Carbapenemase e ESBL
Estrutura química				

Tabela 1: Esquema de classificação dos antimicrobianos escolhidos para o trabalho (Ceftiaxona – CRO, Cefoxitina -FOX, Cefepime - CPM e Imipenem - IMP). Os classificando quanto às suas estruturas, classe, classificação e geração. Fonte: Autor.

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são divididos em diferentes gerações de acordo com essas mudanças de estrutura, a fim de obter uma cobertura de efeito antimicrobiano mais amplo. A modificação nas cadeias laterais do anel lactâmico é uma estratégia para aumentar não só a cobertura em uma maior variedade de bactérias, mas também evadir sistemas de competição com betalactamases (Tooke *et al.*, 2019).

A respeito das resistências descritas, a disseminação desses genes ocorre por duas diferentes vias: por via de clones emergentes bacterianos, ou pela transferência horizontal

desses genes (THG). Em relação a THG, os genes de resistência estão inseridos em plasmídeos, que são disseminados entre uma mesma espécie bacteriana, ou para diferentes gêneros bacterianos. Sabe-se que o intestino humano é composto por uma microbiota variada, a qual tem a interação constante de diferentes gêneros/espécies de bactérias. Este fato elucidado que se trata de um importante reservatório para genes de resistência, pois o contato entre diferentes microrganismos, associado a atividades imunológicas que, quando se tem o uso de antimicrobianos, pode se acometer das estirpes que apresentam resistência, se imporem frente aos outros organismos presentes que não possuem tal mecanismo.

Presume-se que estes genes se sobressaem e se disseminem no trato gastrointestinal (Brolund, 2014). O intestino está diretamente ligado à excreção de fezes que irão carregar estes genes de resistência. Com esse fato, pode-se inferir que a questão do saneamento básico é uma importante forma de entender a disseminação de resistência no meio ambiente. A presença de coliformes portadores de enzimas que codificam para betalactamases, nos efluentes despejados em rios e mares, podem contaminar ecossistemas presentes em área urbana e que, conseqüentemente, retornam para a sociedade, representando um ciclo perigoso que fortifica indiretamente a resistência a beta-lactâmicos (Baqueiro et al., 2019).

1.10 Conceito de Saúde Única (*One Health*)

A interação do homem com o meio ambiente e com os demais organismos vivos é descrita no conceito de *One Health*, que traz consigo a ideia de uma saúde unificada e codependente a nível mundial. Desta forma, quando há um fator problemático em uma das partes, os outros membros conseqüentemente também serão afetados e irão interagir com a mazela, se tornando um ciclo nocivo, como por exemplo, a disseminação de resistência a antimicrobianos (Baqueiro *et al.*, 2019).

No contexto da propagação de bactérias resistentes, alguns fatores negligentes de saúde pública estão intrinsecamente relacionados com o aumento e disseminação da resistência a antimicrobianos (ATM) (McEwen e Colignon, 2018). O uso inadequado de antimicrobianos (ATM), por parte de prescrições médicas equivocadas, automedicação e administração em animais, é de fato um fator que contribui com o aumento da resistência (Deekshit e Srikumar, 2022).

Essa propagação de bactérias resistentes não se limita unicamente a ambientes

clínicos ou hospitalares, mas também é descrita na literatura em microbiotas diversas, como em outros animais, alimentos, esgotos, solos e ambientes aquáticos. Diversos são os fatores que acometem a disseminação nessas variadas esferas (Baqueiro *et al.*, 2019). Porém, a notável presença de enterobactérias resistentes em variados ecossistemas aquáticos se dá, principalmente, em razão de pressões antrópicas, como despejo indevido de esgoto, em regiões estuarinas próximas à costa, e em seus respectivos solos. Sendo estes ambientes selvagens, importantes reservatórios de resistência à antimicrobianos (Lew *et al.*, 2023)

II. Justificativa e contextualização

Face ao exposto, é visto que o Manguezal é um ecossistema de transição entre o ambiente terrestre e marinho, que possui variadas funções às quais confere importância ecológica, e até mesmo econômica a esse ambiente. Porém, a proximidade de alguns desses biomas com ambientes urbanizados acarretam riscos quanto à integridade e salubridade do mangue. O aporte de efluentes advindos de canais de esgoto de diferentes origens, como domésticas, industriais e hospitalares, podem carrear enterobactérias de importância clínica para humanos e, podem chegar ao mangue quando despejados nas águas de rios que cortam manguezais urbanos. Além disso, como agravante a este fato, o uso indiscriminado de antimicrobianos é uma crescente problemática quanto a mutações e aquisições de genes resistência por parte de bactérias patogênicas. Essa pressão seletiva está contribuindo para a ineficiência de importantes classes de antimicrobianos que são amplamente utilizados para o tratamento das infecções ocasionadas por elas. A presença de enterobactérias resistentes no ambiente de Manguezal, por exemplo, põe em risco a saúde das comunidades ribeirinhas que possuem o mangue como fonte de sustento direto, pela pesca para consumo próprio e comercialização de seus pescados. A falta de conhecimento ao lidar com ambiente contaminado vulnerabiliza ainda mais essa população que, em sua maioria, se encontra em estado de marginalização social, o que os distancia inclusive de acesso a atendimentos de saúde de qualidade, e a terapias medicamentosas.

Ademais, vale ressaltar que o deságue dos rios com aporte de efluentes no mar já propicia o contato de moradores de áreas urbanas com esses patógenos, como a comercialização dos frutos do mar pescados em região de mangue contaminado, o que se presume que estes podem carrear enterobactérias resistentes. Este fato auxilia no ciclo de disseminação de genes de resistência no ambiente, que é um agravante em infortuna constante. Desse modo, não apenas aqueles que residem perto de manguezais contaminados estão suscetíveis a infecções resultantes dessas superbactérias. Outro importante ponto é a escassez de estudos da presença de enterobactérias resistentes em ambiente de manguezais urbanos, pois dada a grandiosidade dessa problemática, não há informações suficientes sobre. Assim, a abrangência de estudos nessa temática pode ampliar o entendimento do comportamento desses agentes patogênicos em ambientes aquáticos inseridos no espaço urbano, bem como seus impactos ambientais e clínicos da disseminação constante dos genes de resistência a antimicrobianos na sociedade.

O manguezal do Rio Jequiá, área de estudo da presente proposta, possui uma comunidade ribeirinha que vive às margens do ambiente de floresta de mangue. Além da comercialização dos pescados, que é o sustento de muitos ribeirinhos da região, a comunidade também possui atividades independentes de preservação da floresta de mangue. Por exemplo, os pescadores realizaram um sistema de viveiro de plantas, na esperança de recuperar uma terra que, potencialmente em razão do aporte de poluição, se tornou infértil. Demonstrando um interesse da comunidade na preservação de seu ambiente.

III. Objetivos

1.1 Objetivo geral

Realizar um estudo de bioprospecção de enterobactérias resistentes a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de água do ambiente de manguezal urbano;
- Realizar o isolamento e contagem das estirpes bacterianas presentes nas amostras de água, esgoto e solo do ambiente de manguezal urbano;
- Realizar a triagem inicial de enterobactérias resistentes a beta-lactâmicos presentes nas amostras de água, esgoto e solo utilizando meio específico suplementado com ceftriaxona;
- Avaliar os padrões e possíveis mecanismos de resistência das estirpes bacterianas isoladas frente aos diferentes grupos de beta-lactâmicos (cefalosporina e carbapenêmicos).

IV. Material e métodos

4.1 Área de estudo e amostragem

O presente estudo teve como área experimental o Rio Jequiá, localizado na região da Ilha do Governador, no Estado do Rio de Janeiro. Os pontos selecionados para coleta de água do Rio Jequiá foram divididos no decorrer do curso do rio cujas coordenadas são: A jusante do ambiente de mangue ($22^{\circ}48'43''$ SE), Ponto 1 (P1); dentro do ambiente de Mangue ($22^{\circ}49'18''$ S e $22^{\circ}49'21''$ SE), Ponto 2 (P2) e Ponto 3 (P3), respectivamente; e à montante do ambiente de mangue ($22^{\circ}49'31''$ O), Ponto 4 (P4) (Figuras 5 e 6).

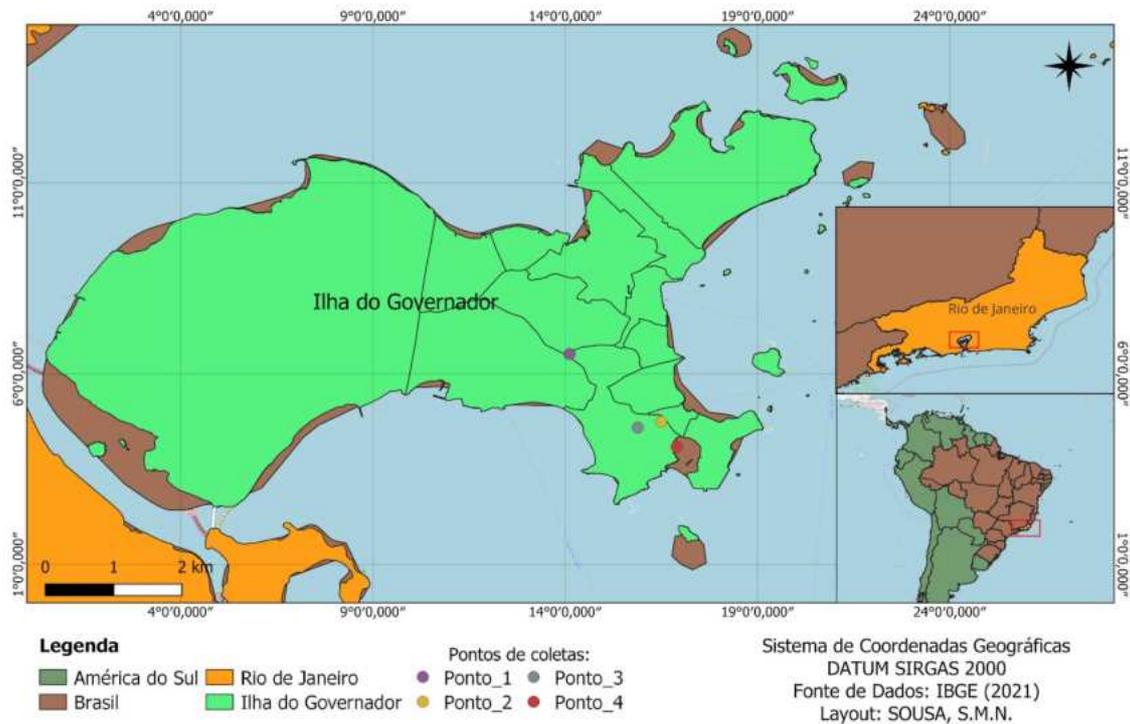


Figura 5- Área de estudo e demarcação dos pontos de coleta ao longo do Rio Jequiá, identificados no mapa através de marcação circular em cores correspondendo às coordenadas geográficas: Ponto 1 (P1 - roxo $22^{\circ}48'43''$ SE); Ponto 2 (P2 - amarelo $22^{\circ}49'18''$ S); Ponto 3 (P3 - cinza $22^{\circ}49'21''$ SE) e; Ponto 4 (P4 – vermelho $22^{\circ}49'31''$ O). **Fonte:** O autor.



Figura 6- Pontos de coleta em representação fotográfica do curso do Rio Jequiá desde sua primeira aparição (rio canalizado, P1 – A), ao longo do ecossistema de manguezal (P2 e P3, em B e C, respectivamente) e em sua foz na Baía de Guanabara (P4 – D). **Fonte:** O autor.

A água correspondente a P1 foi coletada com o auxílio de um balde associado a uma corda e transferida para frascos de polietileno graduado de boca estreita (Nalgon®) com capacidade para 1000 ml, em triplicata biológica, totalizando 3000 ml de amostra. Para a amostragem dos pontos P2, P3 e P4, frascos de polietileno (Nalgon®) foram mergulhados a aproximadamente 10 centímetros em relação ao nível do Rio Jequiá, sendo todas as amostras de água coletadas em triplicata biológica. Foram coletadas também amostras de solo rizosférico (SRP3) e esgoto doméstico (EP3) correspondente ao ponto P3, cujo ambiente também é deságue de esgoto doméstico e tem impactado o desenvolvimento de plantios realizados nessa área conforme relatado pela comunidade local. Para coleta de SRP3 foram selecionadas

aleatoriamente três réplicas de plantas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), sendo cada planta separada uma da outra por aproximadamente 2 m. Em média, 80 g de solo aderido às raízes foram coletados em três pontos no em torno de cada planta para formar uma única amostra composta, a uma distância de 5 cm do caule e nos primeiros 15 cm do horizonte do solo (Figura 7)

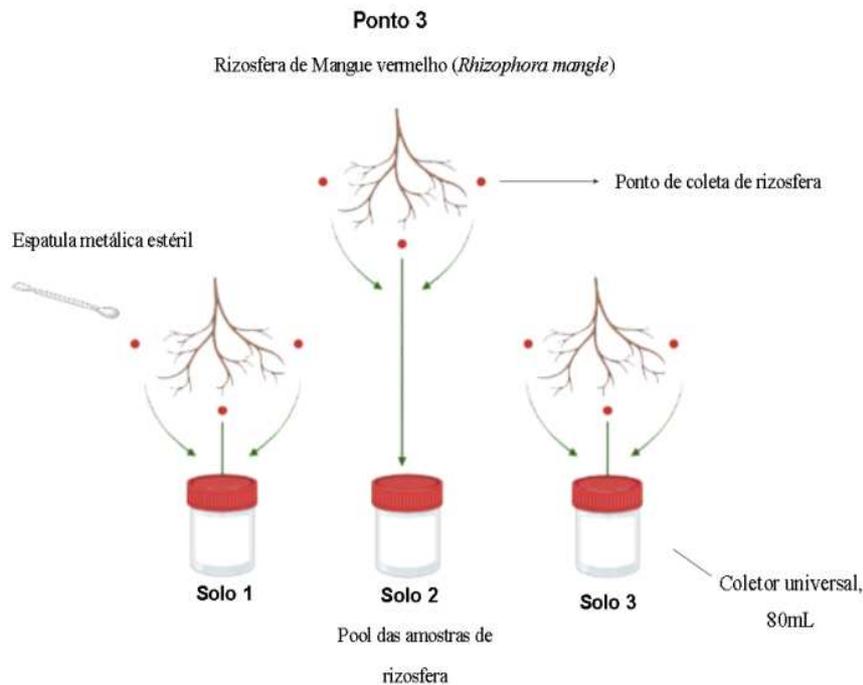


Figura 7- Esquema representativo da coleta de solo rizosférico das plantas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) correspondente ao ambiente de P3.

Para a amostragem de esgoto doméstico (EP3), foram selecionados três canos de esgoto com aproximadamente 2 m de distância entre si também na área de P3. As amostras foram então coletadas a partir do deságue do esgoto em frasco de polietileno graduado de boca estreita (Nalgon®) (1000 ml), conforme representado na Figura 8. Todo o material coletado foi mantido sob refrigeração em caixa de material isotérmico e transportado para o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) para processamento e análises posteriores.

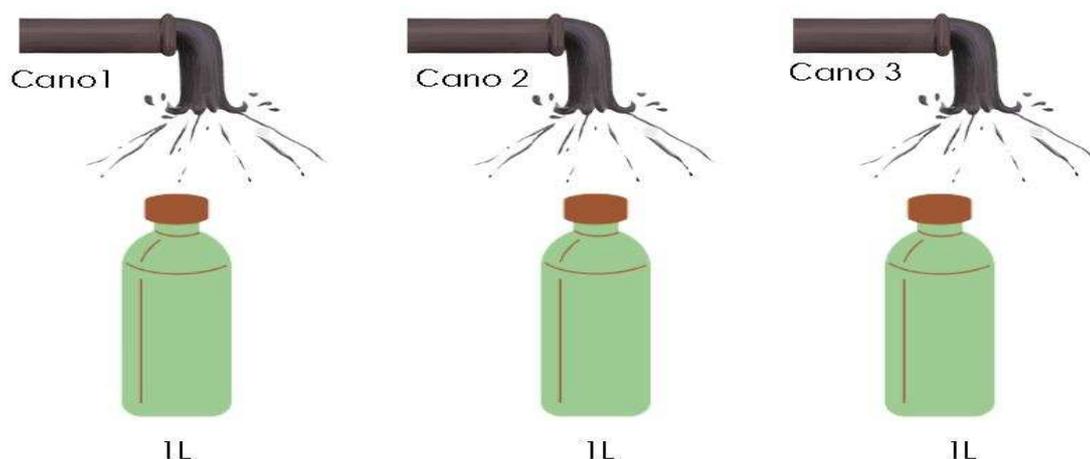


Figura 8- Esquema representativo dos canos de coleta de esgoto correspondente ao ambiente P3.

4.2 Número mais provável de coliformes

Para a detecção de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de água coletadas (P1, P2, P3 e P4), foi utilizado o kit comercial Colilert-18® de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução mãe das diferentes amostras adicionando 25 ml de água em 225ml de água peptonada estéril (diluição 1:1000). As soluções foram então homogêneas e mantidas em repouso para decantação do material sólido. Após este procedimento, 100ml da amostra foram transferidos para frascos adicionados com o meio desidratado Colilert-18® e homogêneos manualmente até a completa dissolução. Em seguida, a mistura amostra/reagente foi vertida em placa Tray com poços múltiplos (Quanti-Tray® /2000, IDEXX, Maine, EUA). Após a selagem a quente das placas em LS-3 Plus (INDEXX), estas foram incubadas a 35° C durante 24 horas. Após o período de incubação, o número de poços grandes e pequenos presumíveis positivos para coliformes foram contados e o resultado foi calculado a partir da tabela do NMP (Número Mais Provável), a qual compõe o manual do Quanti-Tray/2000.

Os poços presumíveis positivos para coliformes totais foram indicados pela mudança de coloração do crescimento para amarelo. Já os poços presumíveis para coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, foram indicados pela mudança de coloração amarela para azul mediante exposição a luz UV (366 nm). Posteriormente, baseado na contagem do NMP nos poços presumíveis, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey

($p < 0,05$) a fim de verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os dados obtidos.

4.3 Contagem e triagem de estirpes resistentes

O isolamento e contagem das bactérias associadas às amostragens água fluvial, solo rizosférico e esgoto doméstico foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Lederberg e Lederberg (1951). As amostras de água (P1, P2, P3 E P4) e esgoto (EP3) foram previamente filtradas em polpa de celulose (Melitta®) para a retenção dos precipitados das amostras líquidas. Posteriormente, as amostras foram filtradas em membranas de 0,46 μ m para retenção de células bacterianas. As membranas utilizadas foram então picotadas e adicionadas em frascos coletores universais contendo 80 ml de solução peptonada estéril e incubadas por um período de 24 horas, a 35 °C. Após este procedimento, alíquotas de 100 μ l do lavado das membranas foram diluídas de forma seriada em 900 μ L de solução salina estéril (0,85%).

Para isolamento e contagem das amostras de solo rizosférico (SRP3), foram diluídos em 900 μ L de solução salina estéril (0,85%) 0,1g da amostra composta de solo coletados a partir das raízes das plantas de mangue vermelho. Para essas amostras, foi realizada a pesagem de 0,1 g de solo, que em seguida foi adicionado em 900 μ L de solução salina 0,9% estéril. A partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} obtidas das amostras de água, esgoto e solo, alíquotas de 100 μ L foram semeadas com o auxílio de esferas de vidro, em ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona (1,5 μ g/mL), para triagem inicial das enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos. Posteriormente todas as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. A contagem de células viáveis foi realizada a partir das placas de diluições que se encontravam dentro dos limites mínimo e máximo do número contável de unidades formadoras de colônia (UFC), valores entre 30 e 300, respectivamente. O resultado foi expresso em número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml de água ou UFC/ml de solo) baseado no cálculo do fator de diluição de acordo com a fórmula:

$$\text{Contagem UFC} = N^{\circ} \text{ de colônias} \times \text{Inverso de diluição} \times 10$$

A partir dos dados obtidos nessa triagem inicial, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as contagens referentes aos pontos de coleta de água (P1, P2, P3 e P4) e entre as contagens das amostragens de solo rizosférico e esgoto (SRP3 e

EP3).

4.4 Isolamento de Estirpes Resistentes

As colônias bacterianas previamente isoladas (item 5.4 desta metodologia), foram semeadas em placas contendo pressão seletiva de beta-lactâmicos pela técnica *replica plating* de acordo com Lederberg (1952). As placas contendo colônias crescidas sob pressão de ceftriaxona (1,5µg/ml), foram colocadas sobre um carimbo de veludo e levemente pressionadas. A partir do veludo carregado da massa bacteriana, foi realizado o carimbo por *replica plating*, para a replicação de colônias em diferentes pressões seletivas e triagem dos diferentes mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos (Figuras 9 e 10).

O aparato do carimbo foi inicialmente aplicado em meio de cultivo sem pressão seletiva, para controle de esterilidade. O crescimento proveniente da placa suplementada com ceftriaxona foi então aplicado ao veludo e replicado em 5 placas: i) sem pressão seletiva, para controle inicial do inóculo; ii) suplementada com cefoxitina (32 µg/mL; Sigma); iii) em cefepima (16 µg/mL, Sigma); iv) em imipenem (4 µg/mL; Sigma); e v) novamente sem antimicrobianos, para controle final do inóculo (Figuras 9 e 10). estirpes

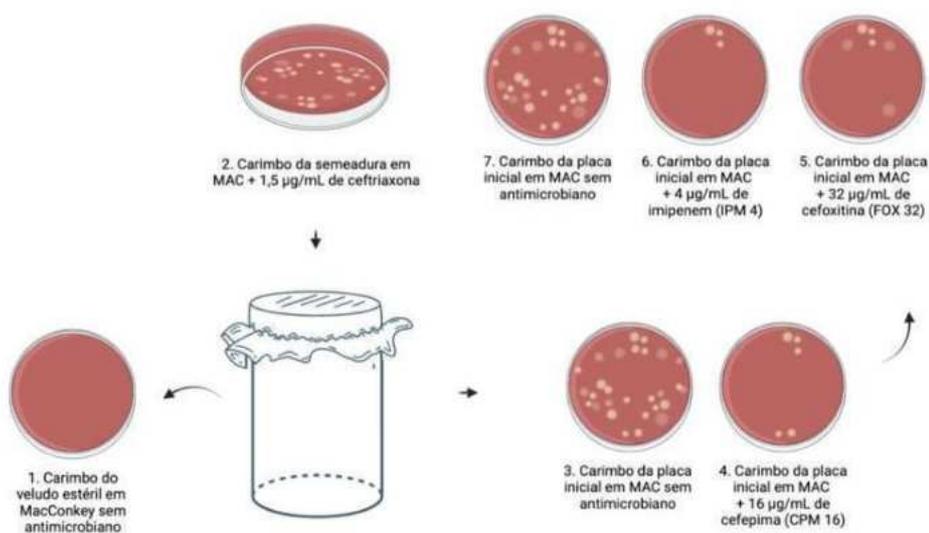


Figura 9- Esquema de realização da técnica de *replica plating*. **Fonte:** Acervo Pessoal

As placas sem pressão seletiva, suplementadas com beta-lactâmicos e placas controle das amostras de água, esgoto e solo foram incubadas por 24 horas a 35 °C para posterior isolamento

das colônias que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados. As colônias crescidas em placas foram caracterizadas a partir da observação da morfologia colonial (tamanho, forma, cor) e todas essas foram selecionadas para análises posteriores. Após esse procedimento, as colônias isoladas foram estocadas em criotubos contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) adicionado de Glicerol 20% e armazenados a -20°C.

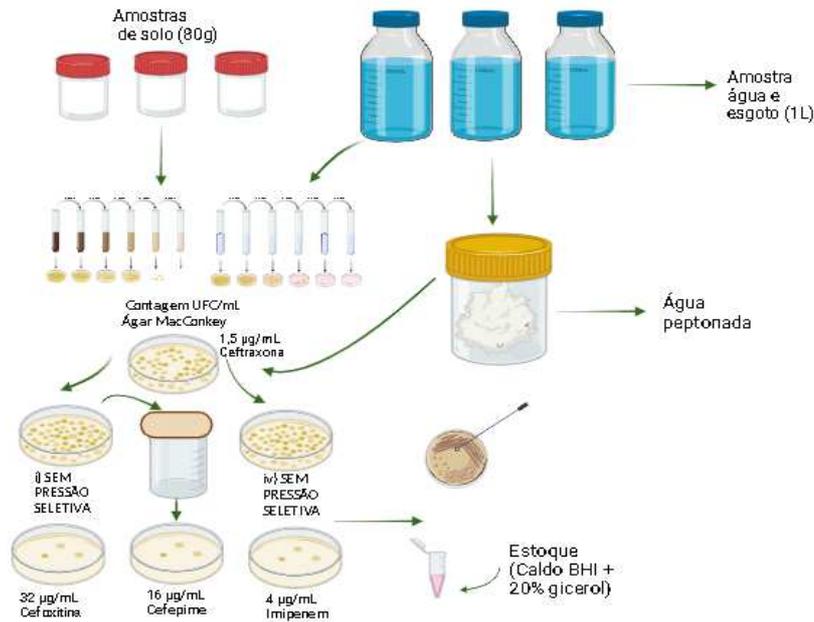


Figura 10- Esquema resumido da metodologia utilizada para a obtenção das estirpes bacterianas nas amostras de água fluvial, solo rizosférico e esgoto doméstico com resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados.

5 Resultados

5.1 Número mais provável de coliformes

A partir da metodologia de Colilert utilizada, por via de diluição de 1:1000, foi realizada a contagem do número mais provável (NMP) das amostras de P1, P2, P3 e P4. Os pontos P1 e P2 não apresentaram diferença estatística significativa no teste de Tukey ($p > 0,05$), mantendo uma contagem de . De acordo com o teste de Tukey ($p > 0,05$), entre P1 e P3/ P4, é visto um decréscimo estatisticamente significativo. Demonstrando uma redução na contagem de células de coliformes termotolerantes conforme o Rio se aproxima de sua foz

A contagem do número mais provável (NMP) de coliformes totais também foi realizada (dados não mostrados). Nela, foi observada de $2,5 \times 10^5$ NMP de células/ml em P1, P2 e P3 e, 5×10^3 NMP de células em P4. Evidenciando um decréscimo na contagem de células bacterianas quando o Rio Jequiá deságua na foz ($p > 0,05$, teste de Tukey).

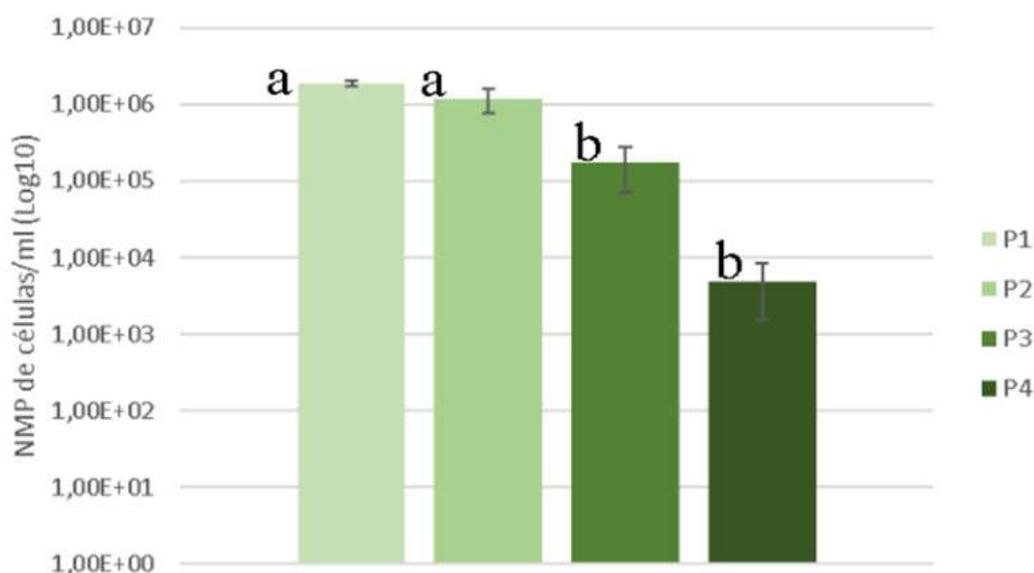


Figura 11- Representação gráfica do número mais provável de coliformes termotolerantes (NMP de células/ml) presentes em cada ponto de coleta (P1, P2, P3 e P4) das amostras de água fluvial. A presença de letras diferentes acima das colunas do gráfico indica diferença estatisticamente significativa entre as contagens ($p > 0,05$, teste de Tukey).

5.1 Contagem de enterobactérias resistentes a Ceftriaxona

Os dados referentes ao gráfico trata-se da contagem de enterobactérias que apresentaram resistência à dosagem de 1,5µg/ml do beta-lactâmico Ceftriaxona, isoladas nas amostras de água fluviais (P1, P2, P3 e P4). De acordo com a contagem de UFC nos pontos de coleta citados, a contagem não evidenciou diferença estatística, e a contagem de 10^7 UFC se manteve durante todo o percurso de coleta do Rio Jequiá. Entretanto, há visualmente um aumento gradativo na contagem, conforme o Rio se aproxima de sua foz (Figura 12)

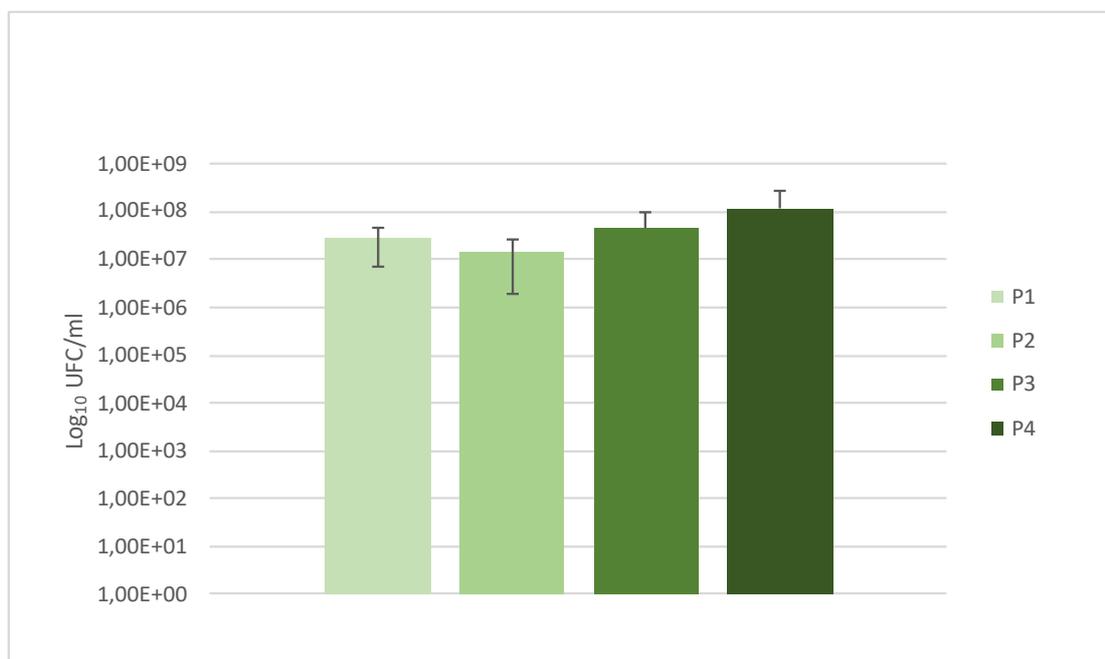


Figura 12- Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) isoladas em cada ponto de coleta (P1, P2, P3 e P4) das amostras de água fluvial que apresentaram resistência à antimicrobiano beta-lactâmico Ceftriaxona (CRO). Não foi indicada diferença estatisticamente significativa entre as contagens ($p > 0.05$, teste de Tukey).

Os dados referentes ao gráfico trata-se da contagem, em UFC, de enterobactérias que apresentaram resistência à dosagem de 1,5 µg/ml de Ceftriaxona. P3 trata-se do ponto referente ao ambiente de floresta de mangue, onde foram coletadas as amostras de solo de rizosfera e esgoto encanado doméstico, os quais deságuam diretamente no ambiente de mangue. Estatisticamente, não houve variações significativas em comparação às contagens de UFC das estirpes resistentes a CRO na amostragem ($p > 0.05$ Tukey). Ao analisar os dados obtidos, nota-se que as amostras de solo (SRP3) e esgoto (EP3), além de serem similares estatisticamente entre si, também são estatisticamente similares ao quantitativo de enterobactérias resistentes a

Ceftriaxona nas amostras de água (P3) em P3. A contagem de 10^7 UFC se manteve durante todo o percurso de coleta (Figura 13).

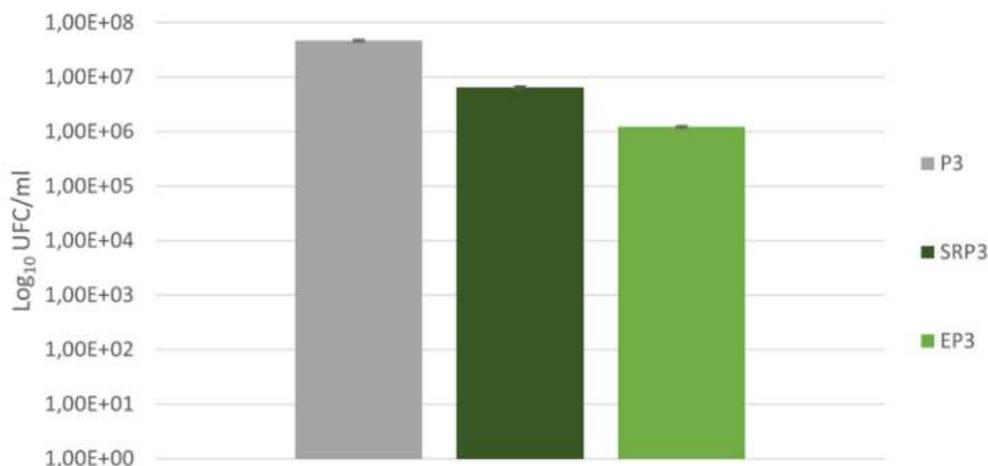


Figura 13- Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ml) das bactérias isoladas dos diferentes pontos de água (P3), solo de rizosfera (SRP3) e esgoto doméstico (EP3) que apresentam resistência à ceftriaxona.

5.3 Isolamento de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos.

A partir do item 1.4 (Isolamento de Estirpes Resistentes) da metodologia, foram obtidos dados referentes a presença de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano. No total de estirpes isoladas, levando em consideração o somatório de todas as amostragens realizadas (água fluvial, solo rizosférico e esgoto doméstico), foram isoladas 289 estirpes bacterianas. Sendo estas distribuídas nas seguintes configurações: 6 % foram isoladas do esgoto; 18% foram isoladas de solo e; 77% foram isoladas de água (Figura 14). Assim, as estirpes isoladas, tratando-se de tipos de amostras coletadas, foram majoritariamente isoladas das águas do rio. Deste percentual total, é visto que 63% dos isolados correspondem aos pontos de coleta P2 e P3 (Figura 15). Este fato demonstra que mais da metade da resistência encontrada nos pontos de coleta de água, se referem ao ambiente de manguezal do Rio Jequiá. Ademais, o ponto que compreende a coleta realizada em área urbana (P1) compreende 20% e o ponto que se refere ao deságue na Baía de Guanabara (P4) compreende 17% do percentual de resistência isolado nas amostras de água (Figura 15).

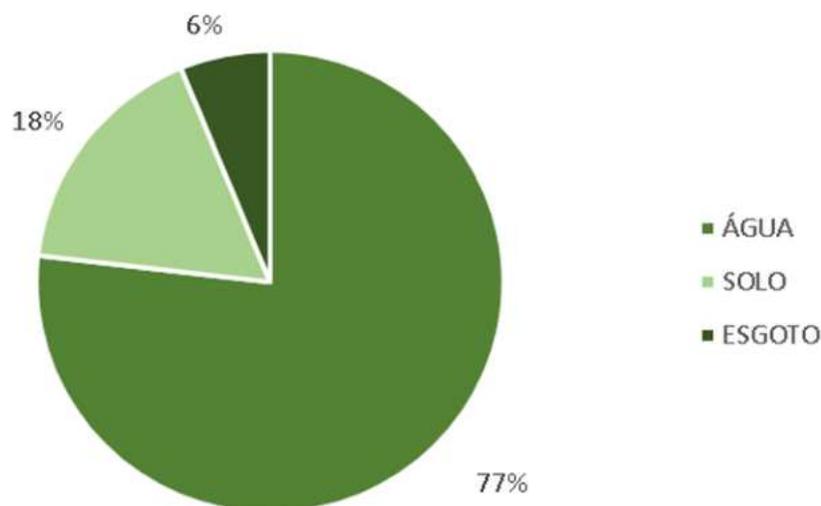


Figura 14- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) referente ao total das estirpes bacterianas isoladas em cada amostragem realizada no estudo (água fluvial, solo de rizosfera e esgoto doméstico).

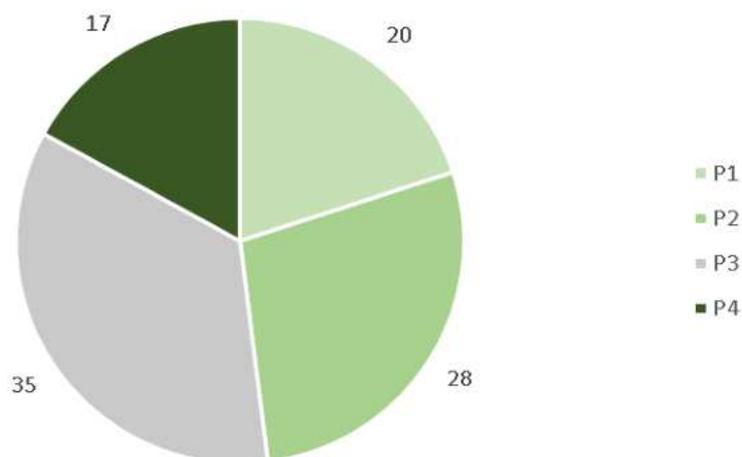


Figura 15 - Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) referente ao total das estirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta de água do Rio Jequiá (P1, P2, P3, P4) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados.

Ao analisar a porcentagem do total de bactérias com resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos testados (Cefoxitina - FOX, Cefepime - CPM e Imipenem – IMP) isoladas nas amostras de água (P1, P2, P3 e P4), juntamente as amostras de solo rizosférico (SRP3) e esgoto (EP3) coletadas, foram obtidos os seguintes percentuais: 52% do total, representando mais da metade das bactérias isoladas, são resistentes a Cefoxitina;. 38% apresentaram resistência à

Cefepime (CPM) e 10% a Imipenem (IMP) (Figura 16).

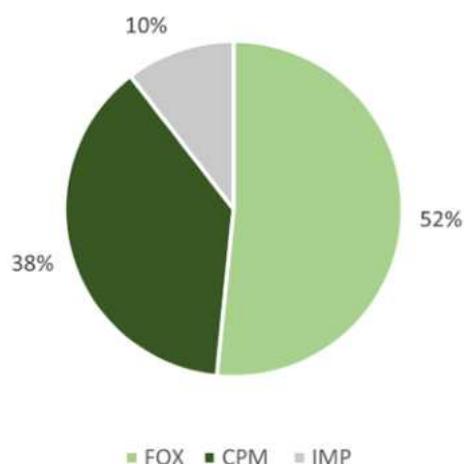


Figura 16- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) das estirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta (P1, P2, P3, P4) das amostras de água fluvial, solo rizosférico (SRP3) e esgoto doméstico (EP3) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Cefoxitina - FOX, Cefepime - CPM e Imipenem – IMP).

Ao analisar a porcentagem do total de bactérias isoladas resistentes aos antimicrobianos testados, em P1 (A), foi visto que 54% apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 46% a Cefepime (CPM) e ausência de bactérias resistentes a Imipenem. Em P2 (B), 48% apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 35% a Cefepime (CPM), e diferente de P1, a resistência a Imipenem já é notada, sendo 17% resistentes a este beta-lactâmico. P3 (C), 32% apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 58% a Cefepime (CPM) e 10% resistentes a Imipenem. P4 (D), foi de 40% apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 42% a Cefepime (CPM) e 18% resistentes a Imipenem. As contagens de bactérias isoladas resistentes aos antimicrobianos testados, nas amostras de solo de rizosfera e esgoto doméstico, os quais foram coletados inseridos no ambiente de P3, apresentaram as seguintes porcentagens %: O total de bactérias isoladas resistentes aos antimicrobianos testados nos solos de rizosfera coletado, (Figura 17, SRP3-E), se distribuiu em 90% que apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 6% a Cefepime (CPM) e 4% resistentes a Imipenem. A porcentagem do total de bactérias isoladas resistentes aos antimicrobianos testados, nas amostras de esgoto doméstico (Figura 17, EP3-F), 64% apresentaram resistência à Cefoxitina (FOX), 22% a Cefepime (CPM) e 14% resistentes a Imipenem (IMP) (Figura 17).

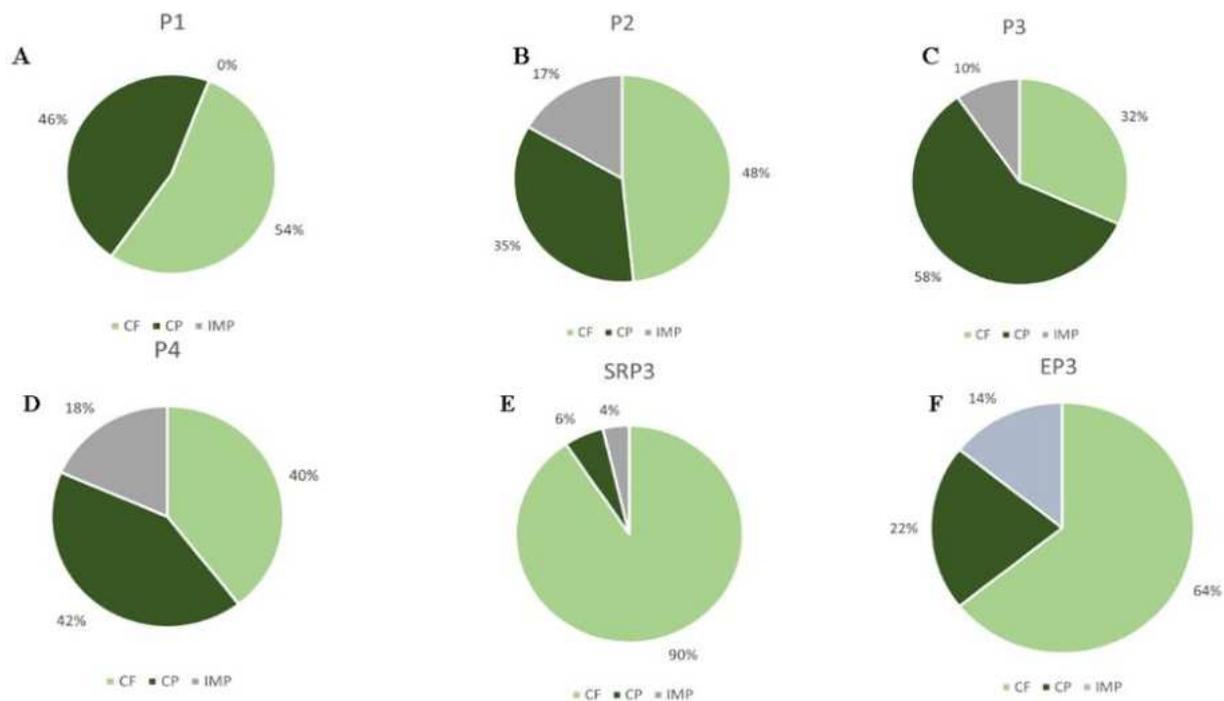


Figura 17- Representação gráfica da distribuição em porcentagem (%) das sestirpes bacterianas isoladas em cada ponto de coleta (P1 - A, P2 - B, P3 - C e P4 - D) das amostras de água fluvial, solo rizosférico (SRP3 - E) e esgoto doméstico (EP3 - F) que apresentaram resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Cefoxitina - FOX, Cefepime - CPM e Imipenem - IMP).

6 Discussão

Os manguezais enfrentam diversos desafios provenientes de fatores como desenvolvimento costeiro, ação antrópica, poluição e aumento do nível do mar. O conceito *One Health* acolhe a ideia de saúde unificada entre o meio ambiente, seres humanos e animais que ali estão inseridos (Mata, Andremondt & Bazzi, 2020).

No presente estudo foi observada ocorrência de enterobactérias resistentes à beta-lactâmicos isoladas de área de manguezal. Neste ambiente, há presença de fauna diversa, deságue no mar e de onde uma colônia de pescadores faz extrativismo de caranguejo para subsistência. A disseminação de resistência antimicrobiana tem se tornado cada dia uma preocupação, uma vez que quando iniciado o ciclo de disseminação, ele se torna constante e crescente, podendo partir de um ou mais eixos, mas afetando a todos (Yang *et al.*, 2018).

Segundo McEwen e Colignon (2018), a disseminação desses microrganismos resistentes se deve, por exemplo, ao despejo indevido de esgotos gerados em ambientes urbanos, que provém de diferentes origens, em rios e regiões estuarinas, que foi observado também no presente trabalho, principalmente nos pontos P1 e P3, os quais recebem diretamente aporte de esgoto.

A análise de NMP de coliformes termotolerantes excedeu o limite de identificação do teste Colilert utilizado que é de 2,419.600 NMP nos pontos P1, P2, P3, em estudos realizados por Baucke *et al.* (2016) também foi observada em excesso a presença destes coliformes, ultrapassando limites aceitáveis em amostras de águas fluviais.

Em relação aos coliformes totais presentes, a contagem de NMP demonstrado uma queda estatisticamente demonstrada, de coliformes totais no rio conforme se aproximava de sua foz. As áreas de coleta do presente estudo, principalmente a área de mangue, além de reter dejetos físicos, pode em decorrência da filtragem que ocorre nessas áreas, reter coliformes associados a estes dejetos, e em consequência pode ocorrer uma associação com o solo, como foi demonstrado também no estudo de Lew *et al.*, (2023)

Na pesquisa realizada por Lew, que avaliaram a presença de coliformes em rios costeiros da Polônia, e foi observada a presença de coliformes e bacterioplânctons na superfície do lago, fortalecendo a ideia de que há a associação desses coliformes ao ambiente de águas de origem fluvial próximas a regiões costeiras observado também no presente estudo. Lew *et al.*, (2023) ainda apontam que coliformes, sejam eles totais ou termotolerantes, são

associados a poluição antropogênica de diferentes origens, e não estão inseridos naquele ambiente por serem associadas ao microbioma, o que pode justificar a alta incidência observada no presente estudo nos pontos P1, P2, P3 respectivamente, que são mais próximos a áreas urbanas.

Foi observada contagem de coliformes termotolerantes estatisticamente reduzida no ponto P4, isso possivelmente se deve ao fato de P4 estar localizado na foz do Rio Jequiá, ponto o qual se tem a saída do ambiente de mangue, sendo a amostra coletada na Baía de Guanabara, onde há uma maior área e um maior volume de água, ocorrendo assim uma possível diminuição nas contagens de NMP/ml em razão de diluição. Esse resultado também foi observado por Lew *et al.* (2023).

Ecossistemas que possuem água doce sofrem com a influência de fatores antrópicos, e em um estudo realizado por Nnadozie e Odume (2019) é comentado sobre os efeitos antrópicos que ecossistemas de água doce sofrem e suas relações com disseminação de resistência antimicrobiana, sendo citado o despejo de esgoto como uma importante fonte de contaminação por enterobactérias, as quais podem possuir genes de resistência.

Enterobactérias são da família Enterobacteriaceae, que se trata de bacilos gram-negativos comuns ao intestino humano. Este grupo de bactérias é de fato uma preocupação em razão de possuírem numerosos mecanismos de resistência a antimicrobianos, sendo a resistência aos beta-lactâmicos uma grande questão sob a perspectiva clínica, uma vez que são as principais drogas administradas para tratamento de patologias ocasionadas por enterobactérias (Logan & Weinstein, 2017).

Para começarmos a selecionar as enterobactérias que potencialmente apresentam resistência a beta-lactâmicos, foi realizada uma triagem preliminar, antes de realizarmos o plaqueamento com pressão seletiva dos antimicrobianos selecionados. Essa triagem foi realizada a partir do plaqueamento da diluição das membranas utilizadas para filtrar as amostras líquidas, sendo a inoculação realizada em Ágar Macconkey, que seleciona as gram-negativas, e adicionado uma dosagem baixa de 1,5 µg/ml do beta-lactâmico de terceira geração Ceftriaxona (CRO).

Realizada a contagem das bactérias crescidas em ceftriaxona nas amostras de água, não houve estatisticamente diferença entre as variáveis, entretanto, a contagem de 10×7 UFC se manteve constante em todos os pontos de coleta de água (P1, P2, P3 e P4).

O mesmo se demonstrou nas contagens de resistência à Ceftriaxona nas amostras de solo e esgoto que foram coletadas inseridas no ambiente de P3. Estas também não demonstraram diferença estatística ao comparar suas contagens

Ao analisar os dados obtidos com a triagem de ceftriaxona nas amostras de água, nota-se uma crescente a partir de P2, ponto de coleta que se refere à primeira aparição do Rio Jequiá em ambiente de mangue. Este fato corrobora com a ideia de que o manguezal retém as enterobactérias que adentram o ambiente de manguezal.

Diferente do observado na discussão dos resultados de NMP de coliformes, a questão de P4 possuir uma maior área e densidade de água, o que seria em potencial um fator diluente, não afetou a contagem de UFC em Ceftriaxona, não houve decréscimo na contagem de em P4. Este fato também contraria os resultados obtidos por Lew *et al.* (2023) nesse aspecto de diluição.

Entretanto, uma explicação para a crescente contagem de bactérias potencialmente resistentes a beta-lactâmicos, se dá em razão de Gram-negativas abrangerem uma variedade de gêneros e espécies, enquanto os coliformes termotolerantes se trata apenas de *Escherichia coli*.

Na triagem de ceftriaxona realizada nas amostras de solo rizosférico e canos de esgoto proveniente das residências que deságuam no solo, comparadas com o ponto de coleta P3, foi observada uma contagem sem diferença estatisticamente mostrada. Este fato sugere que o quantitativo de bactérias isoladas nas amostras de água de P3, é estatisticamente similar ao quantitativo isolado nas amostras de solo rizosférico e esgoto, os quais estão inseridos dentro do ambiente de P3.

Vale ressaltar que o ambiente de coleta P3 é inserido na região de mangue, onde se tem um viveiro de plantas que, de acordo com os pescadores e moradores locais, não está havendo crescimento de plantas naturais do mangue, mesmo com o sistema de plantio desenvolvido por eles.

A similaridade das contagens nos leva a pensar que há uma interação de troca entre as bactérias presentes no esgoto, que desaguam no solo, junto às bactérias presentes nas águas de P3, que possuem contato direto com o solo de Mangue vermelho (floresta escolhida para coleta), em razão dos constantes alagamento que o solo sofre de acordo com a variação de marés.

Um estudo desenvolvido por Khmelevtsova *et al.* em 2020, em variados corpos de água, incluindo pântanos e áreas costeiras em diversas localidades da Rússia, também demonstrou a

presença de bactérias com resistência à Ceftriaxona em amostras de canais de água e seus respectivos solos.

No mesmo estudo, a autora demonstra o isolamento de bactérias resistentes aos grupos beta-lactâmicos das Cefalosporinas e Carbapenêmicos, na microflora marinha autóctone. Khmelevtsova *et al.* afirmou que as enterobactérias resistentes, de origem de poluição antrópica urbana, estão diretamente relacionadas com a questão da aquisição de genes de resistências das bactérias autóctones presentes na microflora do ambiente.

Para compreendermos a distribuição da resistência a beta-lactâmicos ao decorrer do Rio Jequiá, as bactérias isoladas, preliminarmente selecionadas pela pressão seletiva da Ceftriaxona, foram inoculadas, pela técnica de *replica plating*, em placas contendo ágar MacConkey suplementadas, respectivamente, pelos antimicrobianos Cefoxitina, Cefepime e Imipenem. Estes são beta-lactâmicos de diferentes gerações, os quais baseamos nossa pesquisa por enterobactérias resistentes em ambiente de manguezal urbano.

No ponto de coleta P1, onde o rio se encontra encanado e atravessando uma região urbano, foi observada uma ausência de resistência ao antimicrobiano Imipenem, porém, nos subsequentes pontos de coleta, P2, P3 e P4, sendo P2 e P3 já inseridos em ambiente de mangue, obtivemos resistência ao Imipenem, beta-lactâmico de terceira geração pertencente ao grupo dos Carbapenêmicos.

Vale ressaltar que 63%, da resistência total foi isolada nas amostras de água inseridas em ambiente de manguezal (P2 e P3). A ideia central do trabalho é entender se o manguezal serve como um filtro para enterobactérias com resistência a beta lactâmicos. Ao observar o dado que mais da metade de bactérias resistentes estão inseridas em ambiente de floresta de mangue, além da suposição de que o manguezal atua como um filtro para também reter microrganismos resistentes, o manguezal também é um importante reservatório para disseminação de resistência a antimicrobianos.

Um estudo realizado por Nnadozie e Odume (2019) na África do Sul, demonstrou que ambientes aquáticos de água doce, tais como rios, pântanos e regiões costeiras, estão sendo vistos como importantes ambientes para ocorrer a disseminação de genes de resistência, por meio das bactérias oriundas da poluição antrópica, para com bactérias autóctone associadas aos ecossistemas estudados.

Os autores também destacaram a transmissão horizontal de genes (THG) como principal via de disseminação dos elementos genéticos móveis munidos de genes de resistência. A coexistência da comunidade microbiana, inseridas em chamados micronichos, ocasiona a

constante troca entre as bactérias presentes. Essa troca foi vista por Kudinova et al (2019), onde foi analisada a presença de genes de resistência a antimicrobianos utilizados comumente na clínica, para tratamentos de patologias, em ambientes impactados por pressão antrópica, porém essa resistência não foi demonstrada em amostra de águas em ambientes sem impacto urbano.

Entretanto, a disseminação de resistência não se limita apenas ao corpo d'água presente nos variados ecossistemas citados, mas também há a associação de bactérias resistentes em elementos ambientais. Isso foi visto no presente estudo, pela presença de bactérias com resistência a todos antimicrobianos testados (Cefoxitina, Cefepime e Imipenem) nas amostras de solo rizosférico que coletamos.

Em comparação aos antimicrobianos testados, foi demonstrado que a resistência à Cefoxitina representa mais da metade (53%) do total de resistência isolada. Esse fato pode se dar pela Cefoxitina, uma Cefalosporina de segunda geração, sendo o antimicrobiano de geração mais antiga testado. Khmelevtsova *et al.* (2019) também obteve bactérias isoladas de sedimentos de solo presente em corpos d'água na Rússia, com resistência às mesmas classes de antimicrobianos testados neste trabalho, o grupo das Cefalosporinas e Carbapenêmicos.

Ademais, as três amostras de esgoto coletadas apresentaram uma contagem baixa de UFC, isso se deve a adição de produtos químicos e surfactantes também destinados ao esgoto doméstico. Porém apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados. A presença de enterobactérias em amostras de esgoto doméstico entra em concordância com a origem das poluições em ambientes naturais, visto que o habitat comum de enterobactérias é o trato intestinal de animais de sangue quente, como comentou Miłobedzka *et al.* (2021).

Com os dados analisados nos resultados do presente trabalho, aliado à literatura, é notória a importância de se analisar a disseminação de enterobactérias em ecossistemas que sofrem pressão antrópica de ambientes urbanos. O citado conceito de *One Health* nos dá a visão da interação entre humanos, animais e meio ambiente, como comentado por MacWeen e Colligon (208). Visto sob a perspectiva de um manguezal que possui atividade pesqueira, como a comercialização de caranguejos, que vão para a mesa de consumidores de diversas partes do Rio de Janeiro, o entendimento da presença dessas enterobactérias resistentes nesse ambiente é de suma importância para a saúde pública, ademais, se trata de uma região habitada por pessoas marginalizadas, que possuem distanciamento de tratamentos de saúde adequados, e que vivem em constante contato com as águas, solo e, conseqüentemente, esgoto, no ambiente de manguezal.

7 Conclusão

O presente trabalho constitui um estudo acerca da presença de enterobactérias com resistência a beta-lactâmicos em ambiente de manguezal urbano.

- Houve um decréscimo na contagem de NMP dos coliformes termotolerantes, conforme aproximação da foz. Estatisticamente, há diferença significativa.
- Nos pontos de coleta de água, a contagem de CRO não demonstrou diferença estatística entre as amostragens.
- No ponto 3, as contagens de UFC resistentes a CRO não demonstrou diferença significativa estatisticamente, independente das amostras estudadas.
- Em análise a presença de resistência aos antimicrobianos testados, as diferentes amostras estudadas obtiveram resistência. Os pontos de coleta de solo e esgoto, apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados.
- Os pontos de coleta de água apresentaram resistências a todos antimicrobianos testados, exceto o P1.

Futuramente, a partir dos dados que ainda serão gerados com a identificação das enterobactérias resistentes isoladas do presente estudo, pretendemos auxiliar em futuras pesquisas na temática de resistência antimicrobiana em manguezais, assim como contribuir com dados para possíveis ações de conservação de manguezais, que ajudará não só a população ribeirinha, mas também a sociedade como um todo.

8 Referências

DA NOBREGA, A. L. V. E. S., Romeu, R., & KIOHARU NISHIDA, A. A ecdise do caranguejo-uçá, *ucides cordatus* L.(decapoda, brachyura) na visão dos caranguejeiros.

Abdu, N., Abdullahi, A. A., & Abdulkadir, A. (2017). Heavy metals and soil microbes. *Environmental chemistry letters*, 15, 65-84.

ALMEIDA, Vinicius. Poluição e avanço urbano ameaçam manguezais no Brasil. Portal Saneamento Básico. Disponível em: <<https://saneamentobasico.com.br/outros/geral/poluicao-ameacam-manguezais/>>. Acesso em:14 nov 2023.

BIGARELLA, João José. Contribuição ao Estudo da Planície Litorânea do Estado do Paraná. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. jubilee, n. 0, p. 65–110, 2001.

BIÓICOS, P. Manguezais: estrutura, dinâmica e biodiversidade. Disponível em: <<https://www.bioicos.org.br/post/manguezais-estrutura-dinamica-e-biodiversidade>>. Acesso em: 14 nov 2023

BONOMO, Robert A; BURD, Eileen M; CONLY, John; et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 66, n. 8, p. 1290–1297, 2018.

Brenner, D. J., & Farmer Iii, J. J. (2015). *Enterobacteriaceae*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-24.

BROLUND, Alma. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 4, n. 1, p. 24555, 2014.

Bruna Bacaro, et al. “Microrganismos fotoautotróficos de manguezais: uma revisão do papel ecológico e dos bioprodutos de interesse comercial.” *Biocombustíveis, Bioprodutos e Biorrefinação 17.5* (2023): 1457-1477. *oproducts of commercial interest*, Wiley Online Library, 2023.

Bush, K. e Bradford, PA (2016). β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase: uma visão geral. *Perspectivas de Cold Spring Harbor na medicina* , 6 (8).

BUSH, Karen, and BRADFORD, Patricia. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. vol. 6,8 a025247. 1 Aug. 2016,

BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. vol. 62,10 e01076-18. 24 Sep. 2018, doi:10.1128/AAC.01076-18

Chapman, TM e Perry, CM (2003). Cefepima: uma revisão do seu uso no manejo de pacientes hospitalizados com pneumonia. *Jornal Americano de Medicina Respiratória* , 2 (1), 75-107.

Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes: qual a diferença? Food Safety Brazil. Disponível em: <<https://foodsafetybrazil.org/coliformes-totais-e-coliformes-termotolerantes-voce-sabe-diferenca/>>.

CRAIG W.A., ANDES D.R. Cephalosporins. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Edited by: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. – Eighth edition. Philadelphia: Elsevier 2015: 278-292.

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

da Motta Sobrinho, M. A., & de Andrade, A. C. (2009). O desafio da conservação de manguezais em áreas urbanas: identificação e análise de conflitos socioambientais no Manguezal do Pina–Recife–PE–Brasil. *Revista Unimontes Científica*, 11(1/2), 8-16.

da Nóbrega Alves, R. R., & Kioharu Nishida, A. (2002). A ecdise do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* L.(Decapoda, Brachyura) na visão dos caranguejeiros. *Interciencia*, 27(3), 110-117.

de Meireles Nunes, MK (2023). RESISTÊNCIA BACTERIANA POR KLEBSIELLA PNEUMONIAE CARBAPENEMASE (KPC) EM AMBIENTE HOSPITALAR. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação* , 9 (5), 2765-2776.

González-Morcillo, G., Calderón-Hernanz, B., Martín-Fajardo, ML, Calderón-Torres, MD, Raya-Cruz, M., & Sarubbo, F. (2023). Avaliação da prescrição de antibióticos em um serviço de urgências hospitalares: estudo piloto. *Farmácia Hospitalária* , 47 (1), 3-9.

GUIMARÃES, Denise; MOMESSO, Luciano; PUPO, TALLARICO, Monica. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HOLST, Otto. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides â an update. *FEMS Microbiology Letters*, v. 271, n. 1, p. 3–11, 2007.

HWANG, Thomas, et al. Administração antimicrobiana e conhecimento público de antibióticos. *The Lancet Infectious Diseases* 15.9 (2015): 1000-1001.

ICMBio lança Atlas dos Manguezais do Brasil. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/noticias/ultimas-noticias/icmbio-lanca-atlas-dos-manguezais-do-brasil>>.

JANDA, J. Michael ; ABBOTT, Sharon L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 34, n. 2, 2021.

Jia, S.-L., Chi, Z., Liu, G.-L., Hu, Z., & Chi, Z.-M. Fungos em ecossistemas de mangue e suas potenciais aplicações. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–13, 2020. doi:10.1080/07388551.2020.178906

Kandasamy, Kathiresan & Bingham, Brian. (2001). *Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems*. *Advances in Marine Biology*. 40. 81-251. 10.1016/S0065-2881(01)40003-4.

Lederberg, Joshua e Esther M. Lederberg. "Replica de chapeamento e seleção indireta de mutantes bacterianos." *Jornal de bacteriologia* 63.3 (1952): 399-406.

Liang, S., Li, H., Wu, H., Yan, B. e Song, A. (2023). Microrganismos em sedimentos de zonas húmidas costeiras: uma revisão sobre a estrutura da comunidade microbiana, gene funcional e potencial ambiental. *Fronteiras em Microbiologia* , 14 , 1163896.

MANDELL, Geralde L.; BENNETT, Johon E. ; DOLIN, Raphael. *Princípios e prática de doenças infecciosas*. pesquisa.bvsalud.org, p. 1 Disco–1 Disco, 2005. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/crt-6724>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

Manguezais: potencial fonte de microrganismos para o uso como agentes de biocontrole da podridão radicular e promotores de crescimento de plantas em hidroponia. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/908070/manguezais-potencial-fonte-de-microrganismos-para-o-uso-como-agentes-de-biocontrole-da-podridao-radicular-e-promotores-de-crescimento-de-plantas-em-hidroponia>>.

MAVEYRAUD, Laurent et al. Estrutura de raios-X de alta resolução de uma espécie de acil enzima para a classe D OXA-10 β -lactamase. *Journal of the American Chemical Society* , v. 124, n. 11, pág. 2461-2465, 2002.

MOURA, Cindy; OLEGÁRIO, Everton; RIBEIRO, Henrique; et al. Projeto de intervenção manguinhos limpo: restauração do bioma manguezal / Clean mangoes intervention project: manguezal bioma restoration. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 2, n. 1, p. 403–417, 2019. Disponível em: <<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/979>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

Ní Chadhain, Sinéad M et al. An assessment of the microbial community in an urban fringing tidal marsh with an emphasis on petroleum hydrocarbon degradative genes. *Marine pollution bulletin* vol. 136 (2018): 351-364. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.09.002

Nogueira, H. S., de Oliveira Xavier, A. R. E., de Sousa Xavier, M. A., Carvalho, A. A., Monção, G. A., & Barreto, N. A. P. (2016). Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. *Revista unimontes científica*, 18(2), 96-108.:

NUTRITION, Center for Food Safety and Applied. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. FDA, 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>>. Acesso em: 23 jun. 2023

O manguezal e a sua fauna. CEBIMar Notícias. Disponível em: <<http://noticias.cebimar.usp.br/pt/artigos/76-o-manguezal-e-a-sua-fauna>>.

O Manguezal na História e na Cultura do Brasil - Arthur Soffiati. Estante Virtual. Disponível em: <https://www.estantevirtual.com.br/livros/arthur-soffiati/o-manguezal-na-historia-e-na-cultura-do-brasil/3108042608> . Editora Faculdade de Direito de Campos. Acesso em: 23 jun. 2023.

ORCID. orcid.org. Disponível em: <<https://orcid.org/0000-0002-3084-2466>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

Palit, Krishna & Rath, Sonalin & Chatterjee, Shreosi & Das, Surajit.. Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020. 29. 10.1007/s11356-022-19048-7.

Palleroni*, N. J., Pieper, D. H., & Moore, E. R. B. Microbiology of Hydrocarbon Degrading *Pseudomonas*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1787–1798, 2010. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_129

PAPP-WALLACE, Krisztina M.; ENDIMIANI, Andrea; TARACILA, Magdalena A.; et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 4943– 4960, 2011.

PARADIS, Sonia; BOISSINOT, Maurice; PAQUETTE, Nancy; et al. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 2013–2025, 2005.

Pereira, A. L., & Pita, J. R. (2018). Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). *História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto*, 6.

PEREIRA, Leandro; JARDIM, Isabe; FOSTIER, Anne et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 159–169, 2012.

Podolsky, S. H., & Powers III, J. H. (2015). Regulating antibiotics in an era of resistance: the historical basis and continued need for adequate and well-controlled investigations. *Annals of internal medicine*, 163(5), 386-388.

Prada-Gamero, RM, Vidal-Torrado, P., & Ferreira, TO (2004). Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do rio Iriri no canal de Bertioga (Santos, SP). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28, 233-243.

PUPIN, Breno. Atributos microbiológicos em ecossistemas costeiros da Ilha do Cardoso, SP. 2013. xvi, 137 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103875>>.

Reyhan, Enver et al. Superioridade do ceftriaxon à cefazolina em um modelo de rato com icterícia obstrutiva: um estudo experimental. *Academy of Surgical Research* vol. 26,1, 2013: 11-5. doi:10.3109/08941939.2012.687433

ROVAI, Andre S.; COELHO-JR, Clemente; DE ALMEIDA, Renato; et al. Ecosystem-level carbon stocks and sequestration rates in mangroves in the Cananéia-Iguape lagoon estuarine system, southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, v. 479, p. 118553, 2021.

Santos, M. L. C. D. (2023). Avaliação do estado trófico e da comunidade fitoplanctônica no estuário do Rio Potengi, Natal/RN.

SANTOS, M. V. (2005) Apicuns, salgados e manguezais e a ideologização do debate sobre a carcinicultura marinha brasileira. *Revista da ABCC*, nº4, ano 7

SANTOS, Patrícia; SILVA, Gedaias; COELHO, Thaís; et al. Análise farmacoeconômica dos antimicrobianos na unidade de terapia intensiva em um hospital terciário. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 5, p. e104953179–e104953179, 2020. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3179>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

SANTOS, T. O.; ANDRADE, K. V. S.; SANTOS, H. V. S.; et al. Caracterização estrutural de bosques de mangue: Estuário do São Francisco. *Scientia Plena*, v. 8, n. 4(b), 2012. Disponível em: <<https://scientiaplenu.emnuvens.com.br/sp/article/view/1010>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; VALE, C.C.; CINTRÓN, G. Protocolo de monitoramento do ecossistema manguezal - estrutura e características funcionais - como indicador de mudanças climáticas. In: TURRA, A.; DENADAI, M. R. (Orgs.). *Protocolos de campo para o monitoramento de habitats bentônicos costeiros - Rede de Monitoramento de Habitats Bentônicos Costeiros*. São Paulo: ReBentos, 2015. p. 59-76, 201

Schaeffer-Novelli, Yara, et al. "Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian coast." *Estuaries* 13 (1990): 204-218.

SCHAEFFER-NOVELLI, Yara. Manguuezal ecossistema entre a terra e o mar. repositorio.usp.br, 1995. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/000882587>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

Schmidt, A. J., Bemvenuti, C. E., & Diele, K. (2013). Sobre a definição da zona de apicum e sua importância ecológica para populações de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763). *Bol. Técn. Cient. CEPENE*, 19(1), 9-25.

SHENG, Jie; LI, J C; TU, Shan-Tung; et al. bla KPC and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, n. 7, p. 1585–1591, 2012.

SILVA, Aridson; RODRIGUES JUNIOR, Omero. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado dos carbapenêmicos meropenem e imipenem: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 7, p. e44711730195, 2022.

SILVA, Janaina; TORRES, Maria. Assinatura Energética dos Manguezais no Domínio Costeiro Brasileiro. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 14, n. 4, p. 2286– 2303, 2021.

SILVA, Maria Betânia. Estudo fitoquímico e biológico de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f. (Mangue branco). repositorio.ufpe.br. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1375>>. Acesso em: 23 jun. 2023. .

Solos Indiscriminados de Mangues - Portal Embrapa. www.embrapa.br. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/territorios/territorio-mata-sul-pernambucana/caracteristicas-do-territorio/recursos-naturais/solos/solos-indiscriminados-de-mangues>>.

Souza, C. A., Duarte, L. F. A., João, M. C., & Pinheiro, M. A. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica. *Educação Ambiental sobre Manguezais*. São Vicente: Unesp, 16-56, 2018.

SOUZA, C.A.; DUARTE, L.F.A.; JOÃO, M.C.A. & PINHEIRO, M.A.A. 2018. Biodiversidade e conservação dos manguezais: importância bioecológica e econômica, Cap. 1: p. 16-56. In: Pinheiro, M.A.A. & Talamoni, A.C.B. (Org.). *Educação Ambiental sobre Manguezais*. São Vicente: UNESP, Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista.

Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics* (Basel). 2019 Aug 19;8(3):122. doi: 10.3390/antibiotics8030122. PMID: 31430964; PMCID: PMC6784177.

VARELA, Alex Gonçalves. “Uma dádiva das marés”: os estudos sobre manguezais da cientista Marta Vannucci em sua trajetória internacional, 1969-1989. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 27, n. 1, p. 115–132, 2020. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/journal/3861/386162892007/html/>>. Acesso em: 23 jun. 2023.

Vasconcelos Filho, J. I. F. D., Maia, R. C., & Salles, R. (2019). Desempenho dos diferentes métodos de amostragem na caracterização da ictiofauna associada ao manguezal da praia de Arpoiras em Acaraú, Ceará.

WERTH, Brian J. Penicilinas. Manuais MSD edição para profissionais. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e_f%C3%A1rmacos-antibacterianos/penicilinas,>. Acesso em: 14 nov. 2023.

Yuki Murai, A., Tiemy Oyama, K., Davanço Cabrera, G. ., & Ribeiro Almeida, R. . (2022). Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) com antibióticos da classe das cefalosporinas. *Revista Brasileira De Ciências Biomédicas*, 3(1), E0652022, 1–12. <https://doi.org/10.46675/rbcm.v3i1.65>

Zhigang Wang, Walter Fast, Ann M Valentine, Stephen J Benkovic, Metallo- β -lactamase: structure and mechanism, *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 3, Issue 5, 1999, Pages 614-622

ZHUANG, Mei; ACHMON, Yigal; CAO, Yuping; et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, v. 285, p. 117402, 2021