

UNIVERSIDADE DO CONTESTADO – UnC  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ENGENHARIA CIVIL,  
SANITÁRIA E AMBIENTAL (PMPECSA)  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – TECNOLOGIA AMBIENTAL

PAULO REIS JUNIOR

**PERFIL DE CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES EVENTOS HIDROLÓGICOS  
EXPOSTAS AO HORMÔNIO  $17\beta$  –ESTRADIOL (E2)**

CONCÓRDIA

2020

PAULO REIS JUNIOR

**PERFIL DE CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE DIFERENTES EVENTOS HIDROLÓGICOS  
EXPOSTAS AO HORMÔNIO  $17\beta$  –ESTRADIOL (E2)**

Dissertação apresentada no Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental, como exigência parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental, ministrado pela Universidade do Contestado – UnC, Campus Concórdia, sob Orientação da Professora Dr<sup>a</sup> Aline Viancelli.

CONCÓRDIA

2020

Catálogo na fonte – Biblioteca Universitária Universidade do Contestado  
(UnC)

R375p  
2020

Reis Junior, Paulo

Perfil de crescimento e resistência a antibióticos de enterobactérias isoladas de diferentes eventos hidrológicos expostas ao hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E2) / Paulo Reis Junior ; orientador: Aline Viancelli. – 2020.

45 f. il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental) – Universidade do Contestado, Concórdia, 2020.

Bibliografia: f. 37-45

1. Perturbadores Endócrinos. 2. Patógenos. 3. Enchentes. 4. Salmonella. 5. *Escherichia coli*. I. Viancelli, Aline (Orientadora). II. Universidade do Contestado. Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental. III. Título.

CDD 21. ed. 620.007

Elaboração: Josiane Liebl Miranda (CRB-14: 1023)

Paulo Reis Junior

**PERFIL DE CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE  
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA DE DIFERENTES EVENTOS  
HIDROLÓGICOS EXPOSTAS AO HORMÔNIO 17 $\beta$  –ESTRADIOL (E2)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Civil, Sanitária e Ambiental, da Universidade do Contestado.

Concórdia (SC), 30 de setembro de 2020.

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Aline Viancelli  
Coordenador do Programa de Mestrado

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Aline Viancelli  
Orientadora

---

Prof. MsC William Michelin  
Universidade do Contestado

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Gislaine Fongaro  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho  
a minha amada esposa Mari Aurora e ao meu filho Gabriel.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao criador por ter provido as possibilidades que tive e a proteção necessária no caminho que escolhi.

Em especial, a minha amada e carinhosa esposa Mari Aurora Favero Reis que incentivou e gerou a nossa maior riqueza, nosso filho Gabriel Favero Reis.

A meus pais, Paulo Reis e Diva Machado Reis, meu eterno agradecimento por tudo que proporcionaram.

A minha orientadora Aline Viancelli por sua dedicação, paciência, empenho e sinceridade.

Aos professores do mestrado por compartilhar mais que conhecimento, gratidão por toda sabedoria compartilhada.

A Universidade do Contestado pela contribuição financeira por bolsa de pesquisa e, também, por proporcionar a experiência na docência do Ensino Superior.

Aos amigos Jean e Patrícia, por sua ajuda quando precisei.

Ao grande número de pessoas que ao longo da vida compartilharam valores, pensamentos e reflexões que auxiliaram a me melhorar como indivíduo.

A todos os antepassados que não conheci, sou imensamente agradecido pelo esforço em organizar, guardar e transmitir o conhecimento que herdei.

Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso  
o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber.  
(Albert Einstein).

## RESUMO

Todos os dias centenas de substâncias (naturais e sintéticas), juntamente com micro-organismos patogênicos, alcançam o ambiente, especialmente o ambiente aquático, por meio de esgotos e efluentes. Essas substâncias são representadas, entre outros, por fármacos, hormônios, que mesmo em nano concentrações continuam bioativas, e por conta disso são chamadas de perturbadores endócrinos. Neste contexto, uma das substâncias de interesse é o hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E2), encontrado em concentrações superiores a 1 ng·L<sup>-1</sup> em efluentes. Adicionalmente, em efluentes estão presentes bactérias do grupo das enterobactérias, as quais podem sofrer influência do E2 e alterar sua patogenicidade. Esta pesquisa foi realizada com objetivo de avaliar o comportamento metabólico (crescimento) e o perfil de resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de amostras de água coletadas de diferentes eventos hidrológicos, expostas ao hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E2). Sete bactérias pertencentes a diferentes gêneros (*Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* e *Aeromonas*) foram desafiadas durante 24 horas *in vitro* a concentrações de 1, 10 e 100 ng·L<sup>-1</sup> do hormônio E2 e avaliadas também quanto a resistência a antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Os resultados mostraram que as cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris* tiveram o crescimento estimulado com o aumento gradativo de E2 até a concentração de 100 ng·L<sup>-1</sup>. Já a cepa de *Salmonella enteritidis* teve crescimento inibido com concentrações de E2 acima de 10 ng·L<sup>-1</sup>. *Enterobacter gergoviae* e *Escherichia coli* apresentaram crescimento maior quando expostas a 1 ng·L<sup>-1</sup> se comparado com concentrações de 10 e 100 ng·L<sup>-1</sup> de E2. Já *Citrobacter amalonaticus* e *Aeromonas allosaccharophila* sofreram estimulação de crescimento quando expostas a concentrações de 10 ng·L<sup>-1</sup> de E2. Após a exposição a E2, foi observada a resistência a antibióticos de 4 das 7 cepas bacterianas e a 4 das 5 classes de antimicrobianos testadas. Diante disso, evidencia-se a importância dos sistemas de tratamento de efluentes com foco na remoção de perturbadores endócrinos e patógenos. Além disso, destaca-se o agravo para a saúde pública durante períodos pós-enchentes por conta da disseminação destes patógenos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Perturbadores Endócrinos; Patógenos; Enchentes; *Salmonella*; *Escherichia coli*.



## ABSTRACT

Everyday hundreds of substances (natural and synthetic), together with pathogenic microorganisms, reach the environment, especially the aquatic environment, through domestic effluents. These substances are represented, among others, by drugs and hormones, which even in nano-concentrations remain bioactive, and because of that they are called endocrine disruptors. In this context, one of the substances of interest is the hormone 17 $\beta$ -estradiol (E2). Nowadays, in domestic effluents even after receiving treatment at sewage treatment plants, it is usual to find concentrations greater than 1 ng L<sup>-1</sup> of E2. Additionally, bacteria from the group of enterobacteria are present in the sewage, which could be influenced by E2 and alter its pathogenicity. This scenario can be of concern if it is aggravated by flood events, which spread these microorganisms, and if they are resistant to antibiotics. Therefore, this research was carried out with the objective of evaluating the profile of resistance to antimicrobials and the metabolic behavior of enterobacteria, isolated from flood water, exposed to 17 $\beta$ -estradiol hormones (E2). Seven bacteria belonging to different genera and previously isolated from water from hydrological events, were challenged in vitro to different concentrations of the hormone E2 and evaluated for resistance to antimicrobials. The results showed that the strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus vulgaris* had their growth stimulated with the gradual increase of E2 until the concentration of 100 ng L<sup>-1</sup>. The strain of *Salmonella enteritidis* had growth inhibited with E2 concentrations above 10 ng L<sup>-1</sup>. *Enterobacter gergoviae* and *Escherichia coli* showed greater growth when exposed to 1 ng L<sup>-1</sup>, when compared to concentrations of 10 and 100 ng L<sup>-1</sup>. *Citrobacter amalonaticus* and *Aeromonas allosaccharophila* suffered growth stimulation when exposed to concentrations of 10 ng L<sup>-1</sup>. Regarding antibiotic resistance, four of the seven bacterial strains showed resistance to four of the five classes of antimicrobials tested. Therefore, the importance of effluent treatment systems with a focus on the removal of endocrine disruptors and pathogens is evident. In addition, the public health problem during post-flood periods stands out due to the spread of these pathogens.

**KEY WORDS:** Endocrine Disorder; Pathogens; flood events; *Salmonella*; *Escherichia coli*.

## SUMÁRIO

### **1 INTRODUÇÃO13**

#### **1.2 OBJETIVOS14**

##### **1.2.1 Objetivo Geral14**

##### **1.2.2 Objetivos Específicos14**

### **2 REFERENCIAL TEÓRICO15**

#### **2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS E O 17 $\beta$ - ESTRADIOL15**

#### **2.2 EFEITOS ADVERSOS DO E2 EM SERES VIVOS17**

#### **2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ENTEROBACTÉRIAS18**

### **3 MATERIAL E MÉTODOS21**

#### **3.1 ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS21**

#### **3.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA RELAÇÃO DE PERTURBADORES ENDÓCRINOS COM ENTEROBACTÉRIAS21**

#### **3.3 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO22**

#### **3.4 ANTIBIOGRAMA22**

### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO23**

#### **4.1 *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*23**

#### **4.2 *PROTEUS VULGARIS*24**

#### **4.3 *SALMONELLA ENTERITIDIS*25**

#### **4.4 *ENTEROBACTER GERGОВIAE*27**

#### **4.5 *CITROBACTER AMALONATICUS*28**

#### **4.6 *ESCHERICHIA COLI*29**

#### **4.7 *AEROMONAS ALLOSACCHAROPHILA*32**

### **5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS35**

### **REFERÊNCIAS38**

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Excreção diária (<math>\mu\text{g}</math>) per capita de estrogênios por humanos.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 2 - Concentrações de estrogênio (<math>\text{ng.L}^{-1}</math>) no ambiente ou em sistemas de tratamento de efluentes.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 3 - Enterobactérias utilizadas nos testes de desafio com diferentes concentrações de E2 e os respectivos eventos hidrológicas onde foram encontradas. ....</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 4 - Comparativo entre enterobactérias, E2 e resistência a antimicrobianos. ....</i>	<i>35</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfil de crescimento (a) de *Klebsiella pneumoniae* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol (E2); e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....24

Figura 2 - Perfil de crescimento (a) de *Proteus vulgaris* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol (E2); e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....25

Figura 3 - Perfil de crescimento (a) de *Salmonella enteritidis* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....26

Figura 4 - Perfil de crescimento (a) de *Enterobacter gergoviae* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....27

Figura 5 - Perfil de crescimento (a) de *Citrobacter amalonaticus* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....28

Figura 6 - Perfil de crescimento de *Escherichia coli* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....30

Figura 7 - Perfil de crescimento de *Aeromonas allosaccharophila* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefoxitina), Nor (norfloxacin) e Gen (gentamicina). .....32

## 1 INTRODUÇÃO

Diariamente centenas de substâncias naturais ou sintéticas e micro-organismos patogênicos podem alcançar o ambiente, especialmente o ambiente aquático, após serem eliminadas através da urina e das fezes, por humanos e outros animais (KAUR; BALA; BANSAL, 2018). Estes efluentes, se não tratados ou tratados de forma ineficiente, são a principal porta de entrada de poluentes no ambiente.

Dentre as substâncias contidas nestes efluentes chamam a atenção os perturbadores endócrinos (PE) que, mesmo em concentrações baixas como nanogramas (ng) ou microgramas ( $\mu\text{g}$ ), tem potencial para interferir no sistema endócrino de humanos e animais, afetando a saúde, crescimento e a reprodução destes (DAI et al., 2020; FUTRAN FUHRMAN; TAL; ARNON, 2015). Essas substâncias são representadas por ftalatos, alquilfenóis, organoclorados, bisfenol, parabeno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, fármacos, pesticidas, e hormônios como fitoestrogênios, estrogênios naturais e estrogênios sintéticos (BILA; DEZOTTI, 2007). Entre os hormônios classificados como PE, destaca-se o  $17\beta$ -estradiol (E2), um hormônio natural amplamente utilizado como repositor hormonal. Este hormônio é metabolizado pelo organismo e excretado diariamente pela urina, e assim chegando no meio ambiente por meio do esgoto sanitário (MOREIRA, 2008).

Paralelamente a eliminação de hormônios, também são eliminadas por meio das fezes, bactérias do grupo das enterobactérias, sendo que estas podem ser patogênicas ou apenas fazer parte da microbiota intestinal humana (CORRÊA, 2012). O que pouco se considera é que os micro-organismos também podem utilizar hormônios produzidos por humanos para sua própria sobrevivência e sucesso reprodutivo, interrompendo o equilíbrio da microbiota normal do hospedeiro (VOM STEEG; KLEIN, 2017).

Estudos têm mostrado que a bioacumulação e os efeitos toxicológicos em peixes expostos à mistura de E2 e  $17\alpha$ -etinilestradiol foram mais significativos do que a exposição do composto individual (HUANG et al., 2015). Devido à falta de conhecimento abrangente sobre os possíveis efeitos sinérgicos dos desreguladores endócrinos com outros compostos químicos (SHI et al., 2018), os seres vivos estão sendo desafiados no cenário natural com substâncias influenciadoras dos seus metabolismos. Neste sentido, os desreguladores endócrinos tendem a ser diluídos durante o fluxo dos rios (AN et al., 2018). A tendência de redução na concentração de

E2 em cursos d'água, significa que há aumento na exposição do endócrino ao longo do curso e, conseqüentemente, exposição e influência na vida aquática. No entanto, processos como sorção e absorção pelas plantas podem inibir a mobilidade ambiental de compostos com hormônios ativos (CARD; SCHNOOR; CHIN, 2012).

Considerando este cenário, onde diariamente concentrações significativas de resíduos de PE e enterobactérias atingem o ambiente aquático, onde podem interagir com o ambiente, o presente estudo foi desenvolvido com finalidade de investigar o impacto desses resíduos no metabolismo (crescimento) de micro-organismos isolados de amostras de água coletadas durante diferentes eventos hidrológicos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos e o comportamento metabólico de enterobactérias, isoladas de amostras de água provenientes de diferentes eventos hidrológicos, expostas ao hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E2).

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de resistência de enterobactérias frente a antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos
- Avaliar o perfil de crescimento de enterobactérias expostas a diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol (E2);
- Investigar a existência de comportamento espécie específico em relação a respostas à exposição ao 17 $\beta$ -estradiol (E2).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS E O 17 $\beta$ - ESTRADIOL

Certas substâncias naturais e sintéticas têm despertado o interesse de pesquisadores ao longo dos anos, devido ao seu potencial de, mesmo em concentrações baixas (ng e  $\mu$ g), apresentarem bioatividade em diferentes organismos (HAMILTON et al., 2015). Estes compostos foram definidos pela Sociedade de Endocrinologia como substâncias químicas endógenas, ou misturas de compostos químicos que podem interferir no aspecto da ação de hormônios (ZOELLER et al., 2012), e nomeados como desreguladores endócrinos. Exemplos destes compostos podem ser definidos como estrogênios (naturais e sintéticos), fármacos, pesticidas, detergentes, e uma gama de compostos químicos industriais (LIU; KANJO; MIZUTANI, 2010). Estudos com estes compostos têm mostrado resultados associados a interferência negativa nos processos reprodutivos, mudanças de comportamento neurológico, síndromes metabólicas, desordem imune e até mesmo tumores em humanos (BERGMAN et al., 2013).

Entre estes compostos, destacam-se os estrogênios, que são hormônios biologicamente ativos derivados de colesterol e liberados pelo córtex adrenal, testículos, ovário e placenta em humanos e animais (ADEEL et al., 2017), sendo eliminados diariamente através de urina e fezes, e variando conforme o ciclo reprodutivo (Tabela 1). Dentre eles destaca-se o hormônio 17 $\beta$ -estradiol (E2), um hormônio natural e sintetizado amplamente utilizado como repositor hormonal.

*Tabela 1* - Excreção diária ( $\mu$ g) per capita de estrogênios por humanos

Categoria	Estrona	17 $\beta$ estradiol (E2)	Estriol	17 $\alpha$ -etinilestradiol
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres em período fértil	8	3,5	4,8	-
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

Fonte: (WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011).

Nos efluentes domésticos em centros urbanos as concentrações de E2 podem variar de 0,5 e 125 ng L<sup>-1</sup>. Na área rural os níveis de E2 podem variar de 30 a 2.500 ng.L<sup>-1</sup> (Tabela 2) devido a maior concentração de animais confinados (gado), (WISE;

O'BRIEN; WOODRUFF, 2011). Observou-se também que excrementos bovinos podem apresentar concentrações de E2 até 10 vezes superiores do que às encontradas em dejetos humanos (BURKHOLDER et al., 2007). O mesmo perfil foi observado para dejetos de suínos (ADEEL et al., 2017).

*Tabela 2* - Concentrações de estrogênio ( $\text{ng L}^{-1}$ ) no ambiente ou em sistemas de tratamento de efluentes

ÁREA	TIPO	CONCENTRAÇÃO E2 ( $\text{ng L}^{-1}$ )	REFERÊNCIA
<b>Rural</b>	Lagoa facultativa de suínos	1800 – 49000	(LI et al., 2010)
	Cama de aviário em pastagem	3500	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
	Dejetos de suínos	1000 – 1500	(FRANKS, 2006)
	Dejeto de gado tratado em sistema confinado	1250	(BARTELT-HUNT et al., 2012)
	Urina de suíno	85 - 97	(ZHANG et al., 2014)
	Lixiviação em área de pastagem	1,7	(KOLODZIEJ; SEDLAK, 2007)
	Dejetos de suínos	15	(RODRIGUEZ-NAVAS et al., 2013)
	Antiandrogênicas (pesticida)	10 (*)	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
	Dejetos de equinos	0.6 – 4.2	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
<b>Industrial</b>	Lagoa facultativa de laticínio	800 – 27000	(LI et al., 2010)
	Água residuais de laticínio	351 – 957	(LI et al., 2010)
	Água residual de fabrica leite de soja.	250 (*)	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
	Bisfenol / fenólicos (químicos)	130 – 360	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
<b>Urbano</b>	Fertilizante retirado de biodigestor (Fonte primária: Dejeto de suíno e resíduo ind. álcool)	50	(RODRIGUEZ-NAVAS et al., 2013)
	Águas superficiais de lago (abastecimento urbano)	2.52 – 21.82 (9.41)	(DAN LIU et al., 2017)
	STP / efluente	6.2 – 42.2	(PAL et al., 2010)
	Esgoto humano	0.5 – 125	(WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011)
	Água tratada para humanos	0.0782	(SETTINO et al., 2018)
<b>Água natural</b>	Lençóis freáticos de 1 m	2.5	(OLSEN et al., 2007)
	Água do mar	0.83	(PAL et al., 2010)

A ocorrência de contaminação de rios imediatamente após as estações de tratamento de esgoto tem sido observada, apresentando concentrações superiores a  $1 \text{ ng L}^{-1}$  de E2 (WILLIAMS et al., 2009). Observou-se também a contaminação de água de consumo humano com concentrações de  $0,0782 \text{ ng L}^{-1}$  E2 (SETTINO et al., 2018). Estudos apontam que parte dos resíduos de hormônios que chega aos corpos d'água



serão depositados temporariamente no sedimento dos rios (NIE et al., 2015), esse comportamento explica-se pela natureza apolar das moléculas, cuja atração por partículas de matéria orgânica é favorecida, porém essa interação depende das características apolares das moléculas orgânicas com as quais os hormônios interagem (CLARKE; CUMMINS, 2015). Por outro lado, os compostos de características hidrofílicas (polares) tendem a permanecer na coluna d'água (CLARKE; CUMMINS, 2015).

Devido à natureza lipofílica do E2, este tende a se acumular no tecido adiposo de diferentes espécies, como observado em peixes que, após expostos a efluentes contendo resíduos de E2, apresentaram concentrações variando de 0,6-4,2 ng·L<sup>-1</sup> (WISE; O'BRIEN; WOODRUFF, 2011). A internalização de E2 por vegetais, a partir de solos contaminados, mostrou uma acumulação de 1,3 a 2,2 µg·kg<sup>-1</sup> em folhas de alface (ADEEL et al., 2017).

De acordo com a normativa internacional sobre substâncias ou compostos, considerando a possibilidade de risco ao ambiente, a comunidade científica aceita a classificação pelo coeficiente de risco (RQ). Os critérios de classificação do risco para a concentração de PE estão descritos, como de baixo risco (0,01 a 0,1 ng·L<sup>-1</sup>), de médio risco (0,1 a 1 ng·L<sup>-1</sup>) e de alto risco (maior que 1 ng·L<sup>-1</sup>) conforme a concentração (HERNANDO et al., 2006). Os PE são suspeitos de produzir alto risco ecológico, especialmente em espécies representativas da cadeia alimentar tipicamente utilizadas em testes de toxicidade aguda (bactérias, algas e invertebrados).

## 2.2 EFEITOS ADVERSOS DO E2 EM SERES VIVOS

Os relatos dos efeitos à saúde dos peixes em água com a presença do E2 compreendem desde o desenvolvimento sexual alterado, a existência de espécies intersexuais e o comportamento alterado de acasalamento (HAMILTON et al., 2015; KIDD et al., 2007). Os efeitos do E2 foram observados em populações de peixes, que após serem expostos a concentrações de 5 ng·L<sup>-1</sup>, apresentaram redução significativa no número de ovos gerados (CALDWELL et al., 2012). Outros estudos reportaram a feminização de peixes machos em lagos contendo de 5 a 6 ng·L<sup>-1</sup> de E2 (KIDD et al., 2007), além da bioacumulação (ARMAROLI; BALZANI, 2007).

De acordo Lopes (2007) os níveis E2 encontrados no esgoto alcançam em média de 1 a 10 ng·L<sup>-1</sup>, além disso, com o aumento da população mundial, a necessidade de produção de alimentos promove um crescimento na produção animal, que torna-se um contribuidor para a contaminação ambiental por estrogênios de uso veterinário (CORDEIRO, 2009; LOPES, 2007; SCHLEICHER, 2013).

Em particular, o E2 pode impactar nos ecossistemas aquáticos, mesmo em concentrações abaixo de ng·L<sup>-1</sup>, devido à sua atividade estrogênica extremamente alta (ROUTLEDGE et al., 1998).

## 2.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ENTEROBACTÉRIAS

Os PEs e patógenos podem alcançar o meio ambiente, principalmente os cursos d'água, por meio de excretas humanas e animais. Dentre estes patógenos, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são de extrema relevância, principalmente por estarem envolvidas em doenças entéricas com expressiva taxa de mortalidade. As enterobactérias podem fazer parte da microbiota intestinal normal ou serem as causadoras de infecções do trato gastrointestinal e urinário (CORDEIRO, 2009; LOPES, 2007; SCHLEICHER, 2013)

Durante as inundações de áreas urbanas pode ocorrer a dispersão de água contaminada por patógenos, desta forma, patógenos podem alcançar os seres humanos atingidos por inundações e essa situação contribuir para o surgimento de doenças epidêmicas (GOWRISANKAR et al., 2017). Neste contexto, o uso de dados históricos na compreensão da suscetibilidade para o surto de doenças epidêmicas e resistentes a antimicrobianos, pode ser observado após inundações (LAVE; LAVE, 1991).

A diarreia é a manifestação mais comum associada a bactérias do gênero *Aeromonas* em crianças, sendo esses organismos a principal causa de infecções após o contato com água de inundações (GHENGHESH et al., 2008). Deste modo, os relatos indicam que a alta resistência antimicrobiana pode incentivar mais pesquisas para determinar as fontes, os mecanismos de transmissão, o significado clínico, a resistência aos medicamentos e as opções de tratamento das infecções associadas ao *Aeromonas*, com peculiaridades para cada país.

Em outro estudo, relatou-se que as inundações estavam significativamente associadas a um aumento no risco de diarreia (DING et al., 2019). Uma possível causa

desse aumento pode estar relacionada à carga patógena, que influencia na incidência e gravidade da doença (LITTLE et al., 2020). A dificuldade, neste caso, é medir a dose infectante viável em pessoas, tornando difícil estabelecer a relação entre a dose infectante e a probabilidade de desenvolver doença. Também, estabelecer relação entre a concentração patógena e a possível contaminação por exposição ao ambiente (MARK et al., 2018).

*Klebsiella* sp. é outro patógeno que pode estar presente em águas de enchentes. Um estudo (CABRAL, 2010) relata a influência da presença de *Klebsiella* sp. em fábricas de celulose e papel. Os relatos apontam que a água captada do meio ambiente apresentou 84% de coliformes fecais (teste padrão) e, após utilizarem em seus processos industrial e tratarem seus efluentes, estes eram devolvidos com 90% de coliformes fecais. A investigação desse aumento demonstrou que a origem deste aumento, após uso industrial, está relacionada aos estágios de polpação iniciais neste tipo de fábrica, com presença abundante de *Klebsiella* sp. em todas as etapas de processamento da indústria de celulose e papel (CABRAL, 2010).

Ainda relacionado ao contexto socioeconômico, aspectos sinérgicos de elementos químicos, E2 e enterobactérias ao meio ambiente, estudos apontam para a influência do arsênico utilizado em químicos agrícolas (dessecantes, herbicidas) ou como conservante para indústria da madeira e em outras atividades industriais (ISHIGURO, 1992). Neste contexto, o alcance de determinados químicos pode, especialmente em vertebrados, produzir uma resposta imune inata que é vital para potencializar a resposta imune adaptativa (NAYAK; LAGE; KIM, 2007). Na pesquisa, esses autores apontam que na exposição de 2 a 10 ppb de arsênio, considerados níveis seguros na água potável, resultou em um aumento superior a 50 vezes na carga viral e pelo menos 17 vezes na carga bacteriana em embriões de peixes. Dessa forma, os micro-organismos estão ativos e adaptando-se aos efeitos sinérgicos do meio ambiente.

Os fenômenos das inundações urbanas decorrentes da incapacidade dos sistemas de drenagem é um problema global (MARK et al., 2018). Pesquisas relatam a relação entre enchentes urbanas e risco à saúde para a população, devido ao contato direto com as águas infectadas por patógenos, ainda são pouco compreendidas. Neste contexto ainda há o frequente relato da presença de genes resistentes a antimicrobianos em ambientes aquáticos urbanos, o que é preocupante. Neste contexto, foi mencionada concentração de até 30 vezes maior nos sedimentos

dos rios em cidade, quando comparados com o curso do rio antes da cidade (MARATHE et al., 2017).

A explicação provável é que mesmo com o avanço no uso de fármacos, principalmente os antibióticos, a *Escherichia coli*, em mais de 20 cepas e outras enterobactérias apresentaram resistência a sulfonamidas, ampicilina, tetraciclina 55,7% 54,1% 39,3%), demonstrando que as enterobactérias e as cepas comuns estudadas possam ser multirresistentes ao uso antimicrobiana (HORN et al., 2015). A resistência aos antibióticos é considerada problema de saúde pública em todo mundo e devido ao uso indiscriminado dessas substâncias na produção de alimentos ou na assistência humana, enterobactérias podem apresentar resistência antimicrobiana elevada (ETERNA DA COSTA; MACHADO, 2017).

As enchentes urbanas, agravam ainda mais, com a urbanização e deficitária infraestrutura de drenagem urbana. Nesse caso, com o transbordamento de esgotos ou outras fontes de contaminação, mantém patógenos ativos nas superfícies urbanas após as enchentes e aumentam os riscos para a saúde pública (SCOULLOS et al., 2020).

Há apontamentos que em superfícies urbanas contaminadas por patógenos, esses podem ser inativados naturalmente pôr a exposição a luz solar (LAVE; LAVE, 1991). Para os autores, é comum que área sem incidência de luz solar também sejam acometidas por enchentes, pois as pessoas suportam inundações ocasionais em seu porão durante anos e passaram a aceitar isso, apenas limpam a lama ou o esgoto.

Neste contexto, a mitigação de riscos ambientais beneficiará a saúde da sociedade (PRÜSS-USTÜN et al., 2017). Sendo os rios urbanos ecossistemas impactados que podem desempenhar um papel importante como reservatórios para bactérias resistentes a antibióticos (PROIA et al., 2018). Essa situação, demonstra a importância do conhecimento dos riscos a exposição de patógenos dispersos nas águas de inundação e da diversificação patógena resistência antimicrobianos como sendo uma rota plausível de transmissão direta a sociedade ou de forma indireta nas superfícies após as inundações (MARK et al., 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS

Para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de 17  $\beta$ - estradiol (E2) em enterobactérias, foram utilizados sete gêneros deste grupo (Tabela 3) previamente isoladas de amostras de água coletadas em diferentes eventos hidrológicos do Rio dos Queimados (FONSECA, 2018).

Tabela 3 - Enterobactérias utilizadas nos testes de desafio com diferentes concentrações de E2 e os respectivos eventos hidrológicas onde foram encontradas.

Enterobactéria	Ocorrência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de seca, chuva e em eventos de inundação.
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Salmonella enteritidis</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de chuva e inundação.
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de seca, chuva e em eventos de inundação.
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de seca.
<i>Escherichia coli</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de seca, chuva e em eventos de inundação.
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	Isoladas de água do Rio dos Queimados em período de chuva.

Fonte: (FONSECA, 2018).

#### 3.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA RELAÇÃO DE PERTURBADORES ENDÓCRINOS COM ENTEROBACTÉRIAS

A fim de avaliar a influência do E2 no perfil de crescimento das enterobactérias isoladas a partir de amostras de água coletadas durante diferentes eventos hidrológicos, testes in vitro foram conduzidos utilizando solução de 1 ng·L<sup>-1</sup>, 10 ng·L<sup>-1</sup> e 100 ng·L<sup>-1</sup> de E2 (pureza  $\geq$  98% - Infinity Pharne®) dissolvido em DMSO, representando concentração média deste contaminante no ambiente. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi abaixo dos níveis tóxicos para células bacterianas.

As respectivas enterobactérias isoladas foram avaliadas após estímulo com E2 quanto ao crescimento por até 24 h. Todos os testes foram realizados em duplicatas e réplicas técnicas e utilizou-se controle negativo bacteriano não estimulado com o hormônio.

### 3.3 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO

As cepas bacterianas isoladas das amostras de água provenientes dos diferentes eventos hidrológicos foram inicialmente cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 18 h a 37°C em estufa bacteriológica. Após este período as culturas foram diluídas em solução salina 0,9% até que atingiu-se a densidade de turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland (LENNETTE et al., 1985); posteriormente 1 mL do inóculo foi transferido para caldo nutriente acrescido de 1, 10 ou 100 ng·L<sup>-1</sup> de E2, sendo novamente incubadas a 37°C durante 18 h. Para cada bactéria avaliada, foram crescidos também em meio de cultura sem adição de hormônio, sendo assim o controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Após a incubação, 100 µL do crescimento bacteriano foi semeado em ágar nutriente e mantido 18 h a 37°C em estufa bacteriológica. Após este período quantificou-se as respectivas unidades formadoras de colônia (UFC).

### 3.4 ANTIBIOGRAMA

Para o teste de sensibilidade aos antibacterianos utilizou-se ágar Mueller Hinton de acordo o método de Difusão em Disco de Kirby Bauer (LENNETTE et al., 1985). Foram testados os antimicrobianos das classes das penicilinas (ampicilina 10µg), cefalosporinas (cefoxitina 30µg), carbapenêmicos (imepenen 10µg), fluoroquinolonas (norfloxacin 10µg) e aminoglicosídeos (gentamicina 10µg).

Estes foram escolhidos com base na recomendação do Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST). A classificação como sendo sensível ou resistente seguiu o recomendado pelo EUCAST (2020) de acordo com o tamanho do halo de inibição.

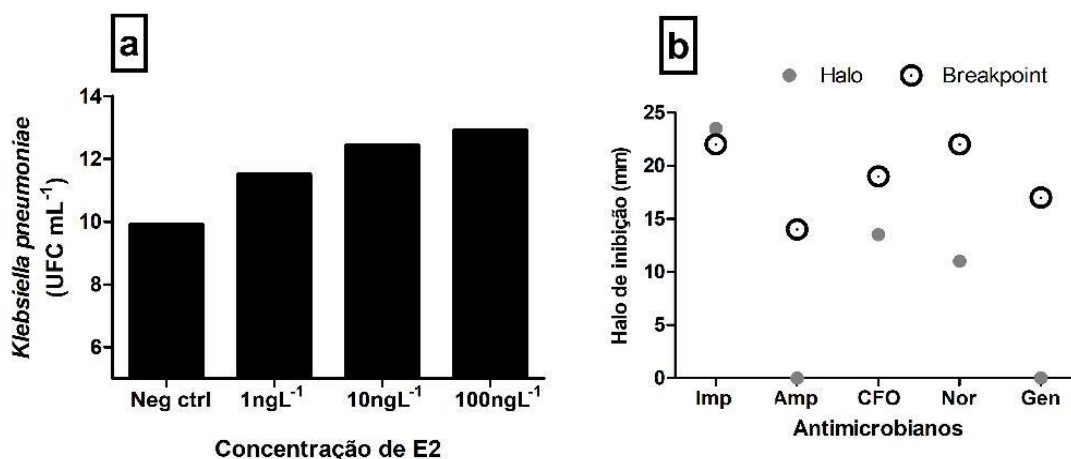
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Os resultados do crescimento das cepas de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17 $\beta$ -estradiol estão apresentados na Figura 1a. É possível observar que, com o aumento da concentração de hormônio, também houve aumento no número de unidades formadoras de colônia (UFC), indicando assim que houve estimulação do crescimento se comparado ao controle negativo (sem adição de hormônio). O crescimento bacteriano exposto a 1 ng·L<sup>-1</sup> foi de 1 log<sub>10</sub> (90%) a mais se comparado ao controle negativo.

Já para as concentrações de 10 e 100 ng·L<sup>-1</sup> o aumento foi de 2 log<sub>10</sub>, o que é equivalente a 99% -, sendo que é possível observar uma tendência de aumento contínuo. A Figura 1b apresenta os resultados dos testes de antibiograma. É possível observar que das cinco classes de antibióticos testadas, a cepa de *Klebsiella pneumoniae* foi resistente a quatro delas. Higgins e Hohn (2008) observaram que cepas de *K. pneumoniae* tiveram o crescimento induzido quando expostas a 17  $\beta$ -estradiol em concentração da magnitude de 1 ng·L<sup>-1</sup>. *K. pneumoniae* é um patógeno oportunista responsável por uma importante proporção (4 a 8%) de infecções (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Os isolados de *K. pneumoniae* estão cada vez mais resistente a múltiplos agentes antimicrobianos, incluindo quinolonas, beta-lactamases e cefalosporinas (PATERSON et al., 2000). Surto hospitalares de *K. pneumoniae* são frequentes e a disseminação inter-hospitalar de cepas resistentes já foram descritas (MONNET et al., 1997).

Figura 1 - Perfil de crescimento (a) de *Klebsiella pneumoniae* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ -estradiol (E2); e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



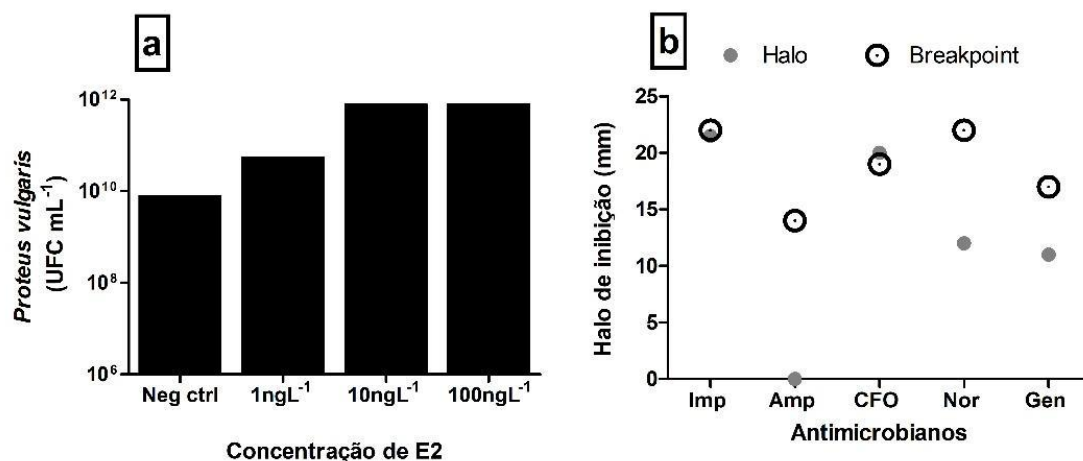
#### 4.2 PROTEUS VULGARIS

Os resultados do crescimento das cepas de *Proteus vulgaris* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ -estradiol estão apresentados na Figura 2a. É possível observar que, com o aumento da concentração de hormônio, também houve aumento no número de unidades formadoras de colônia (UFC), indicando assim que houve estimulação do crescimento, se comparado ao controle negativo (sem adição de hormônio).

O crescimento bacteriano exposto a 1 ng L<sup>-1</sup> de E2 foi de 1 log<sub>10</sub> (90%) se comparado ao controle negativo. Já para as concentrações de 10 e 100 ng L<sup>-1</sup> de E2, o aumento foi igual, sendo de 2 log<sub>10</sub>, o que é equivalente a 99% de aumento. Os testes de antibiograma revelaram que a cepa de *Proteus vulgaris* foi resistente a três das cinco classes avaliadas (Figura 2b). *Proteus vulgaris* tem sido associado infecção humana como osteomielite craniana, infecção do trato urinário (BARAN et al., 2017; MANDAL et al., 2015; USLU; SENGUL; AKTAS, 2011), além de co-infectar humanos com outros de micro-organismos como *Candida albicans* (GODON et al., 1998).



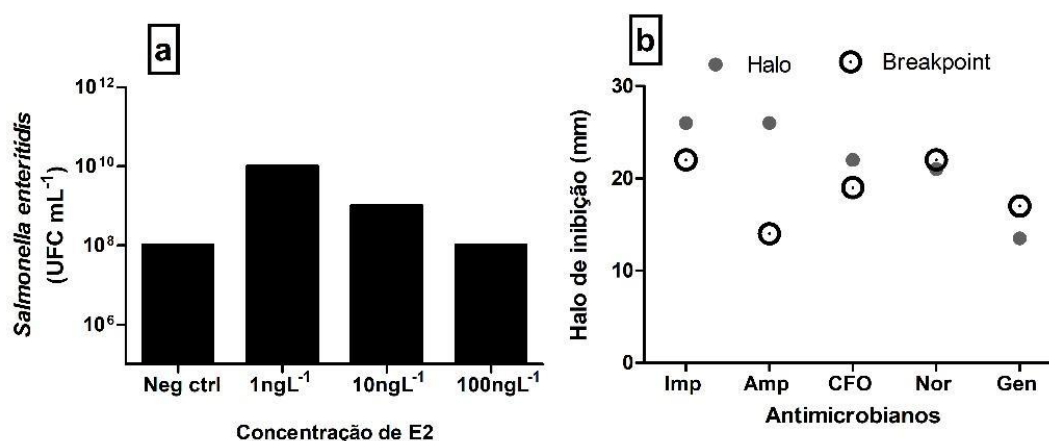
Figura 2 - Perfil de crescimento (a) de *Proteus vulgaris* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol (E2); e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. *Breakpoint*: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



#### 4.3 SALMONELLA ENTERITIDIS

Os resultados do crescimento das cepas de *Salmonella enteritidis* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ -estradiol estão apresentados na Figura 3a. Observa-se que com a concentração de 1 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio houve um aumento no crescimento bacteriano de 2 log<sub>10</sub> (99%). No entanto, o aumento na concentração de hormônio para 10 ng·L<sup>-1</sup> levou a diminuição de 1 log<sub>10</sub> (90%) se comparado ao crescimento obtido com 1 ng·L<sup>-1</sup>, mas mesmo assim, se comparado ao controle negativo (sem hormônio) o crescimento aumentou em 1 log<sub>10</sub> (90%). Já para a maior concentração de hormônio, 100 ng·L<sup>-1</sup>, não houve aumento do crescimento bacteriano se comparado ao controle negativo. De forma geral, observa-se uma tendência de inibição conforme são aumentadas as concentrações de hormônio no meio de cultura. No que se refere ao perfil comportamental frente aos antibióticos testados, a cepa de *Samonella enteritidis* foi uma das cepas com menor percentual de resistência, sendo sensível a três das cinco classes de antibióticos testadas (Figura 3b).

Figura 3 - Perfil de crescimento (a) de *Salmonella enteritidis* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. *Breakpoint*: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



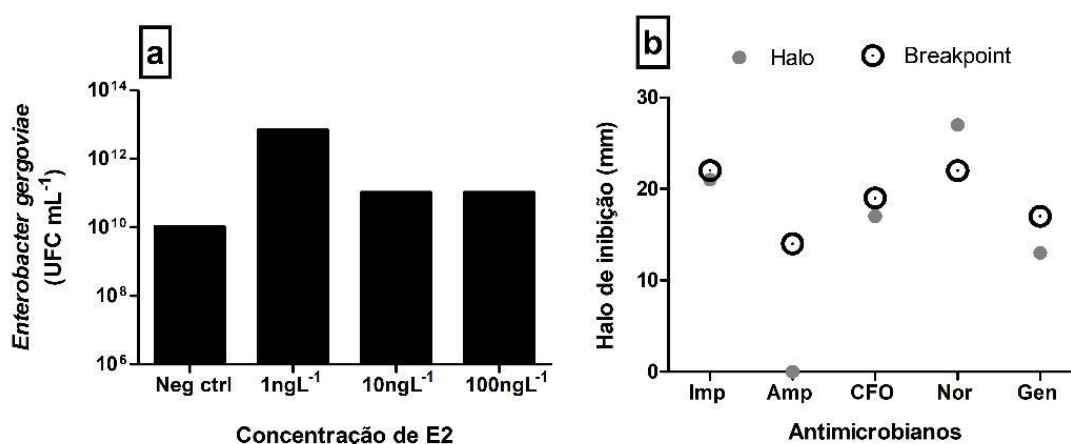
Estudos conduzidos com camundongos mostraram que fêmeas expostas a 17  $\beta$ - estradiol tornaram-se susceptíveis a *Salmonella typhimurium*, no entanto o estudo associa o fenômeno a alterações no funcionamento do sistema imunológico (KITA et al., 1989).

As bactérias do gênero *Salmonella* estão entre as principais causas de gastroenterites bacterianas em países desenvolvidos, sendo os sorotipos *Enteritidis* e *Typhimurium* os mais frequentes associados a patologias humanas, principalmente devido ao consumo de ovos de galinha e carne contaminados (VELGE; CLOECKAERT; BARROW, 2005; VOETSCH et al., 2009). No entanto, o surgimento de outros sorotipos de *Salmonella* spp. foi observado ao longo do tempo, como a *Salmonella enterica* sorotipo Senftenberg (*S. senftenberg*), cujas são consideradas potencialmente patogênicas para humanos (BOUMART et al., 2012). A gastroenterite causada por *S. senftenberg* é um problema significativo particularmente em áreas de alta densidade populacional, com saneamento precário bem como, em áreas próximas de criação de bovinos e habitação humana (HU et al., 2008). Essas doenças intestinais invasivas afetam mais de 1,3 bilhão de pessoas causando 3 milhões de mortes anualmente, o que torna a espécie intimamente associada aos índices de morbidade e mortalidade (HU et al., 2008).

#### 4.4 ENTEROBACTER GERGOVIAE

Os resultados do crescimento das cepas de *Enterobacter gergoviae* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol estão apresentados na Figura 4. Observa-se que com a concentração de 1 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio houve um aumento no crescimento bacteriano de 3 log<sub>10</sub> (99,99%). No entanto, o aumento na concentração de hormônio para 10 e 100 ng·L<sup>-1</sup> levou a diminuição de 2 log<sub>10</sub> se comparado ao crescimento observado com a exposição a 1 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio. No entanto, se comparado ao controle negativo, houve crescimento de 1 log<sub>10</sub> (90%). Os resultados dos testes de antibiograma indicam que a cepa de *Enterobacter gergoviae* foi resistente a quatro das cinco classes de antimicrobianos testadas (Figura 4b).

Figura 4 - Perfil de crescimento (a) de *Enterobacter gergoviae* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



*Enterobacter gergoviae* tem se tornado patógenos nosocomiais, cada vez mais frequentes, de modo que as cepas se tornam resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, especialmente entre os isolados e recuperados de unidades de terapia intensiva (PITOUT et al., 1997).

Em unidade de tratamento intensivo neonatal (UTIN), medidas de controle imediatas e eficazes são alternativas a infecções nosocomial por *Enterobacter gergoviae* e apresentaram um fim abrupto da contaminação (GANESWIRE; THONG; PUTHUCHEARY, 2003). As infecções por essas espécies geralmente estão

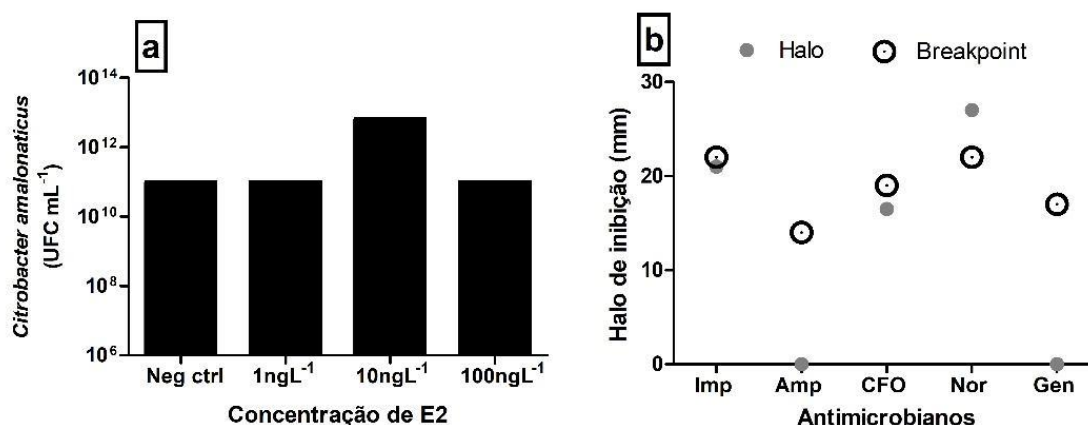
associadas à presença de fatores de risco, como internação prolongada, especialmente se parte da internação foi realizada em unidade de terapia intensiva. Outros fatores, como imunossupressão e crianças, apresentam maior suscetibilidade.

Bactérias *Enterobacter* emergem de reservatórios comuns que incluem feridas e os tratos gastrointestinais, urinários e respiratórios. A *Enterobacter* normalmente ocorre em pacientes com doenças subjacentes de longa data que receberam agentes antimicrobianos ou quando o uso de antibióticos de amplo espectro contribuiu para o aumento da proeminência das infecções por *Enterobacter* (CHOW; YU; SHLAES, 1994). Nestes casos as espécies de *Enterobacter* têm uma propensão a emergir resistentes à terapia antibiótica administrada.

#### 4.5 CITROBACTER AMALONATICUS

Os resultados do crescimento das cepas de *Citrobacter amalonaticus* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol estão apresentados na Figura 5a. Observa-se que o aumento de 99% no crescimento bacteriano ocorreu apenas quando as cepas foram expostas a concentração de 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . As demais concentrações tiveram o mesmo comportamento que o observado para o controle negativo. Quando ao perfil de resistência a antimicrobianos (Figura 5b) observa-se que a cepa de *Citrobacter amalonaticus* apresentou resistência a quatro das cinco classes de antibióticos testadas.

Figura 5 - Perfil de crescimento (a) de *Citrobacter amalonaticus* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



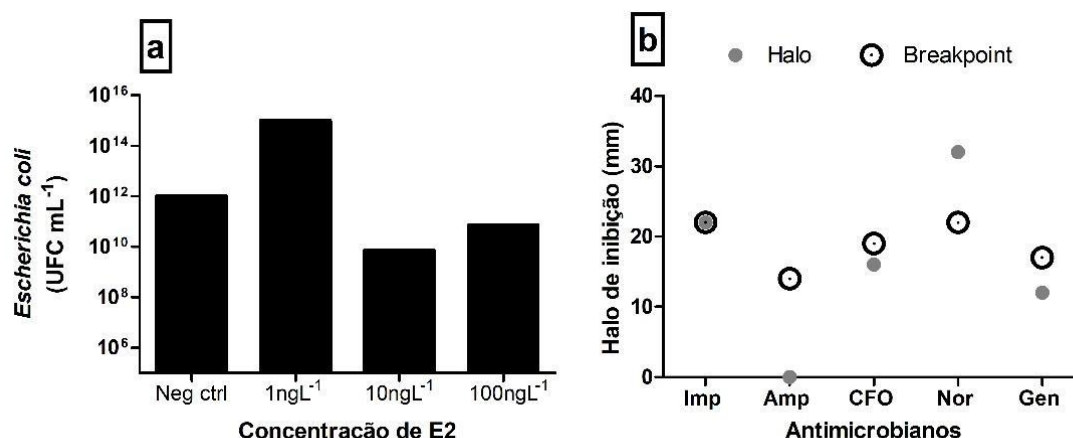
Outras bactérias deste mesmo gênero, a *Citrobacter rodentium* mostrou-se passível de alteração no padrão de crescimento e, também, nas suas características biológicas em resposta ao estresse de exposição a hormônios (BAILEY et al., 2010).

A bactéria *Citrobacter amalonaticus* (*C. amalonaticus*) é considerada um patógeno emergente e responsável por infecções do trato urinário, principalmente em pacientes imunocomprometidos, além de estar associada a infecções invasivas, como osteomielites, artrites, meningites e peritonites (GARCIA et al., 2016; LIEN et al., 2018). *C. amalonaticus* já foi relacionada a casos de febre tifoide, patogenia da qual é mais comumente causada por exemplares de *Salmonella entérica* sorotipo tiphy, embora, outros organismos como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (todos eles isolados no período chuvoso nesse estudo) também possam clinicamente e fisiopatologicamente se qualificarem como potencialmente capazes de induzir a síndrome da febre entérica (GALÁN, 2016; SUWANSRINON et al., 2005).

#### 4.6 *ESCHERICHIA COLI*

Os resultados do crescimento das cepas de *Escherichia coli* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol estão apresentados na Figura 6a. Observa-se que quando expostas a concentração de 1 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio 17  $\beta$ -estradiol, houve um aumento de crescimento 3 log<sub>10</sub>, equivalente a 99,99%. Para as concentrações de 10 e 100 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio, houve inibição do crescimento bacteriano, em 99 e 90%, respectivamente. Os resultados dos testes com as cinco classes de antimicrobianos revelaram que a cepa de *Escherichia coli* foi resistente a três delas (Figura 6b).

Figura 6 - Perfil de crescimento de *Escherichia coli* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. *Breakpoint*: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



Gümüş et al. (2019) observaram a resposta de cepas de *E. coli* uropatogênicas expostas a diferentes concentrações de 17 $\beta$ -estradiol e, também, norepimefina. Os resultados indicaram que cepas diferentes (mesmo pertencendo a mesma espécie) reagiram de forma antagônica ao mesmo hormônio, com estimulação e inibição do crescimento. Corroborando estes estudos, Nishikawa e Baba (1985) mostraram a redução na capacidade de aderência de cepas de *E. coli* às células endometriais de ratas nas quais foram administradas doses de estradiol.

Estudos conduzidos com fêmeas adultas de camundongos, mostraram que quando essas foram expostas ao hormônio 17  $\beta$ -estradiol, tornaram-se mais susceptíveis a infecções por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Toxoplasma gondii* (KITA et al., 1985; PUNG et al., 1985). No caso destes estudos, a susceptibilidade foi atribuída a ação do hormônio na redução da atividade de células *natural killer* e macrófagos e, também, a redução na produção de citocinas responsáveis pela resposta imune (PUNG et al., 1985; ROBERTS; SATOSKAR; ALEXANDER, 1996).

A sobrevivência de cepas de *E. coli* em útero de coelhas durante o ciclo lúteo e folicular foi acompanhada por Matsuda et al. (1985), onde observaram que durante o período lúteo a sobrevivência bacteriana foi prolongada se comparada ao tempo de sobrevivência observado durante o período folicular. No período lúteo observou-se também maior concentração do hormônio 17  $\beta$ - estradiol no plasma. Neste contexto,

a sobrevivência foi atribuída ao atraso no sistema de defesa imunológica presente no útero, causado pelo 17  $\beta$ - estradiol.

Em relação ao comportamento da *E. coli* na presença de hormônios, estudos demonstraram que na presença do hormônio noradrenalina, cepas de *E. coli* enterotoxigênica apresentaram aumento na produção de fatores de virulência como adesinas, e cepas de *E. coli* enteroehorrágica aumentaram a produção de toxinas (LYTE et al., 1997; LYTE; FRANK; GREEN, 1996). Além disso, foi observado estímulo de crescimento em cepas não patogênicas de *E. coli* isoladas de amostras ambientais (FREESTONE et al., 2002).

Outros estudos também mostraram que durante processo infeccioso causado por *E. coli* em ratos, houve aumento da concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) na corrente sanguínea (JONES; WESTFALL; SAYEED, 1988). No caso da noradrenalina, a indução do crescimento bacteriano pode estar relacionada ao fornecimento de íons ferro por meio da interação com proteínas “sequestradoras de ferro” como a transferrina e lactoferrina (FREESTONE et al., 2000).

No entanto, outros estudos relacionados ao papel no hormônio noradrenalina no crescimento bacteriano, mostrou que não houve indução do crescimento das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes fragilis*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnie*, *Enterobacter sp*, e *Salmonella choleraesuis* (BELAY et al., 2003), destacando desta forma que o comportamento poderia ser espécie específico para noradrenalina.

Estudos sobre o papel do sistema nervoso entérico no processo de infecção mostrou que grande parte da interação de toxinas bacterianas e as terminações nervosas, resulta no aumento do movimento intestinal desencadeando diarreia e perda de eletrólitos (JONES; BLIKSLAGER, 2002).

Todos estes estudos mostram que as infecções por cepas de *E. coli*, sofrem interferência de inúmeros fatores. Isso é importante, pois embora a maioria das *E. coli* sejam habitantes comensais do trato gastrointestinal de animais de sangue quentes, existem também algumas cepas variantes extremamente virulentas, como as *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC) e *E. coli* meningite neo natal (NMEC). Todas elas associadas a problemas como surtos de diarreias, cólicas, náuseas, vômitos, além de outras complicações (ALEXANDER; HEANEY; SHAMAN, 2018; CROXEN; FINLAY, 2010; VON SPERLING; BASTOS; KATO, 2005). As variâncias que causam

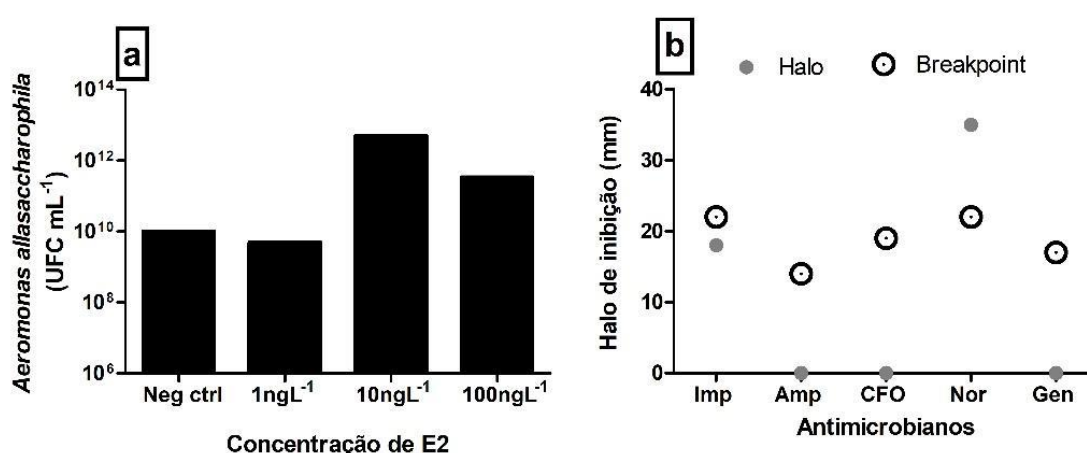


significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo são as EPEC e EHEC, as quais são, respectivamente, uma das principais causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento, e causas de diarreias sanguinolentas principalmente em crianças e idosos em países desenvolvidos (ROSSI et al., 2018).

#### 4.7 AEROMONAS ALLOSACCHAROPHILA

Os resultados do crescimento das cepas de *Aeromonas allosaccharophila* quando desafiadas com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol estão apresentados na Figura 7a. Observa-se que com a concentração de 1 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio não houve aumento do crescimento bacteriano, no entanto, com 10 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio houve aumento de 99,9% (1 log<sub>10</sub>). A concentração de 100 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio também apresentou aumento no crescimento bacteriano de 90%, quando comparado ao controle negativo, mas 90% menor do que o crescimento observado para as bactérias expostas a 10 ng·L<sup>-1</sup> de hormônio. O perfil das cepas *Aeromonas allosaccharophila* frente ao desafio com cinco das principais classes de antimicrobianos revelou resistência a quatro classes.

Figura 7 - Perfil de crescimento de *Aeromonas allosaccharophila* quando desafiada com diferentes concentrações de hormônio 17  $\beta$ - estradiol; e halo de inibição (b) formado frente a antimicrobianos. Breakpoint: halos de diâmetros inferiores representam resistência bacteriana ao respectivo antibiótico. Imp (Imipenem), Amp (ampicilina), CFO (cefotaxima), Nor (norfloxacina) e Gen (gentamicina).



Estudos já mostraram que hormônios como as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) são capazes de estimular os crescimentos de bactérias do gênero *Aeromonas* (KINNEY et al., 1999).



A bactéria *Aeromonas allosaccharophila* foi caracterizada a partir de fezes humanas, e desde então tem sido associada a infecções oportunistas especialmente em indivíduos imunocomprometidos (HAYES et al., 2007; JANDA; ABBOTT, 2010; MARTINEZ-MURCIA et al., 1992) podendo causar diarreias, intoxicação alimentar e gastroenterites (SAAVEDRA et al., 2007).

A relação entre micro-organismos que habitam o sistema gastrointestinal e os hormônios desperta interesse especialmente pelo fato de que o intestino contém mais de 100 milhões de neurônios com inervação se estendendo por todas as camadas do trato, sugerindo que essa interface específica dos nervos, micro-organismos e células imunológicas podem ser cruciais para homeostase normal e processo infeccioso (SANTOS; PERDUE, 2000).

Os mecanismos relacionados ao estímulo no crescimento bacteriano provocado por hormônios como 17  $\beta$ -estradiol podem ser variados. Kornman e Loesche (1982), por exemplo, descrevem que para as espécies bacterianas *bacteroides melaninogenicus* e *bacteroides gingivalis*, os hormônios funcionam como substitutos para a vitamina K, essencial para o crescimento destas.

A indução de crescimento pelo hormônio 17  $\beta$ -estradiol foi observado no fungo patogênico oportunista *Candida albicans* por meio da estimulação para a mudança dos fungos para a forma hifal, além disso observou-se que as cepas previamente expostas ao hormônio apresentaram maiores resistência à inativação térmica, quando comparadas à cepas não expostas (ROCHA et al., 2001; ZHANG et al., 2000). Em fungos, a exposição a fatores de estresse, como hormônios ou outros compostos químicos, pode levar a síntese de compostos, como foi observado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que ao ser exposta a peróxido de hidrogênio aumentou a síntese de 115 proteínas e simultaneamente a repressão de outras 52, que de diferentes formas modificam o comportamento da levedura de modo a promover sua sobrevivência (GODON et al., 1998).

Neste cenário também destaca-se o fato de que alguns estudos mostram que a exposição a compostos químicos, sejam eles hormônios, pesticidas ou fármacos, tem levado a alterações genéticas em bactérias, e como consequências dessas alterações temos modificações na biologia funcional, que pode culminar em cepas resistentes a antibióticos (RAMAKRISHNAN et al., 2019). Isso é preocupante, especialmente se considerarmos que a situação atual em relação a resistência a antimicrobianos já é um problema consolidado.

Mesmo com uma gama enorme de variáveis, estudos de campo têm apontado que homens são mais susceptíveis a infecções bacterianas e virais do que as mulheres, e que esse perfil pode ser modulado por hormônios relacionados ao sexo (KLEIN, 2000).

O efeito de hormônios esteroides em doenças produzidas por bactérias depende da espécie bacteriana, do tipo hormônio e dos níveis de hormônio. Homens, por conta da testosterona, têm maior propensão a infecções por *Coxiella burnetti*, agente causador da febre Q; enquanto as mulheres têm propensão a infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, por conta do estrogênio (GUILBAULT et al., 2002; LEONE et al., 2004). Essas interações também têm sido observadas na resposta imunológica pós-vacinal, onde mulheres apresentam maior resposta do que homens (KLEIN et al., 2015).

Avaliar o comportamento metabólico de enterobactérias, isoladas de água de enchentes, expostas ao hormônio E2, contribuiu em esclarecer como a provável carga de patógenos pode ser influenciada por E2, mesmo em concentrações baixas. De modo geral, os resultados mostraram que as enterobactérias apresentaram crescimento maior quando expostas ao E2, quando comparado com a ausência E2.

Embora nestes cenários não se possa estabelecer a carga infectante necessária para contaminar um indivíduo (LITTLE et al., 2020), pode-se inferir que concentrações maiores de patógenos apresentam melhor relação para a existência de carga infectante efetiva. Cabe destacar, que inundações e possíveis contaminações por enterobactérias podem ocorrer simultaneamente com outras infecções e, nessa situação, o conhecimento de antimicrobianos eficazes podem mitigar as relações sinérgicas das enfermidades. As infecções bacterianas secundárias muitas vezes complicam quadros pré-existentes como infecções virais, ou mesmo procedimentos cirúrgicos (AVADHANULA et al., 2006).

#### 4.8 COMPARAÇÃO ENTRE ENTEROBACTÉRIAS

Os principais dados observados no presente estudos estão apresentados na Tabela 4. Quanto à aos antimicrobianos, essa é uma situação preocupante, especialmente se considerado a resistência a antimicrobianos. Essa situação atual é

um problema consolidado, e presente na maioria das amostras nos três cenários estudados.

A situação do E2 é mais bem compreendida quando relacionada a concentração de E2 com os períodos. Neste contexto, para a concentração de  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  encontramos duas amostras de enterobactérias com crescimento de  $3 \log_{10}$  para cada período (seca, chuva inundação) e, apenas duas amostra para todos os períodos não apresentou influência no crescimento na presença de E2 para essa concentração. Na concentração de  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  encontramos uma amostra de enterobactéria com crescimento de  $3 \log_{10}$  no período de chuva e, uma amostra que apresentou influência negativa no crescimento para cada período (seca, chuva, inundação), essa redução foi de  $1 \log_{10}$ . Na concentração de  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  não houve crescimento de  $3 \log_{10}$  para nenhum dos períodos e, uma amostra para cada período (seca, chuva, inundação) não apresentou influência no crescimento na presença de E2 para essa concentração. Entretanto, ocorreu para essa concentração a influência negativa no crescimento de uma amostra de enterobactérias para cada período (seca, chuva, inundação), essa redução foi de  $1 \log_{10}$ . Desse modo, as concentrações menores de E2 apresentaram crescimento maior das enterobactérias. Neste contexto, em período de chuva é muito provável deduzir que a água pluvial alcance o meio ambiente aquático e, conseqüentemente, dissolva as substâncias nele contidas e, portanto, diminua a concentração de E2. No período de inundação, essa situação também deve ocorrer. Portanto, essa condição atmosférica provavelmente deve estar influenciando o crescimento das enterobactérias no meio ambiente aquático com presença de E2.

Tabela 4 - Comparativo entre enterobactérias, E2 e resistência a antimicrobianos.

Período	Enterobactérias	E2 (ng.L <sup>-1</sup> )			Resistência à Antimicrobianos
		1	10	100	
Seca	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	04/05.
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	$3 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	04/05.
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>		$2 \log_{10}$		04/05.
	<i>Proteus vulgaris</i>	$1 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	03/05.
	<i>Escherichia coli</i>	$3 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	03/05.
Chuva	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	04/05.
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	$3 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	04/05.
	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>		$3 \log_{10}$	$1 \log_{10}$	04/05.
	<i>Proteus vulgaris</i>	$1 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	$2 \log_{10}$	03/05.

	<i>Escherichia coli</i>	3 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	03/05.
	<i>Salmonella enteritidis</i>	2 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>		01/05.
Inundação	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 log <sub>10</sub>	2 log <sub>10</sub>	2 log <sub>10</sub>	04/05.
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	3 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	04/05.
	<i>Proteus vulgaris</i>	1 log <sub>10</sub>	2 log <sub>10</sub>	2 log <sub>10</sub>	03/05.
	<i>Escherichia coli</i>	3 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>	03/05.
	<i>Salmonella enteritidis</i>	2 log <sub>10</sub>	1 log <sub>10</sub>		01/05.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Há influência do E2 no crescimento das enterobactérias em diversas concentrações, evidenciando aumento na carga patógena.

As enterobactérias estudadas mostraram resistência a muitos dos antimicrobianos.

Sistema de tratamento de efluentes deve ser eficaz quanto ao tratamento de enterobactérias e o E2.

Sistema de drenagem urbana adequado deve manter os patógenos distantes das superfícies urbanas.

Em período de inundação ocorre a diluição das concentrações de E2, contribuindo com o crescimento e o aumento na carga patogênica, que aumenta a infecção dos expostos a inundação.

## REFERÊNCIAS

- ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107–119, fev. 2017.
- ALEXANDER, K. A.; HEANEY, A. K.; SHAMAN, J. Hydrometeorology and flood pulse dynamics drive diarrheal disease outbreaks and increase vulnerability to climate change in surface-water-dependent populations: A retrospective analysis. **PLoS Medicine**, v. 15, n. 11, p. 1–25, 2018.
- AN, J. et al. Estimation of human-origin estrone and 17 $\beta$ -estradiol concentrations in the Han River, Seoul, South Korea and its uncertainty-based ecological risk characterization. **Science of The Total Environment**, v. 633, p. 1148–1155, ago. 2018.
- ARMAROLI, N.; BALZANI, V. The Future of Energy Supply: Challenges and Opportunities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 1–2, p. 52–66, jan. 2007.
- AVADHANULA, V. et al. Respiratory Viruses Augment the Adhesion of Bacterial Pathogens to Respiratory Epithelium in a Viral Species- and Cell Type-Dependent Manner. **Journal of Virology**, v. 80, n. 4, p. 1629–1636, 15 fev. 2006.
- BAILEY, M. T. et al. Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1509–1519, 2010.
- BARAN, I. et al. Chronic lower extremity wound infection due to *Kerstersia gyiorum* in a patient with Buerger's disease: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 608, 6 dez. 2017.
- BARTELT-HUNT, S. L. et al. Effect of growth promotants on the occurrence of endogenous and synthetic steroid hormones on feedlot soils and in runoff from beef cattle feeding operations. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 1352– 1360., 2012.
- BELAY, T. et al. Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. **Life Sciences**, v. 73, n. 12, p. 1527–1535, ago. 2003.
- BERGMAN, Å. et al. **State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012**. [s.l.] World Health Organization, 2013.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.
- BOUMART, Z. et al. Heterogeneity of persistence of *Salmonella enterica* serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- BURKHOLDER, J. et al. Impacts of Waste from Concentrated Animal Feeding Operations on Water Quality. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 2, p.

308–312, fev. 2007.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657–3703, 15 out. 2010.

CALDWELL, D. J. et al. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1396–1406, jun. 2012.

CARD, M. L.; SCHNOOR, J. L.; CHIN, Y.-P. Uptake of Natural and Synthetic Estrogens by Maize Seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 34, p. 8264–8271, 29 ago. 2012.

CHOW, J.; YU, V.; SHLAES, D. Epidemiologic perspectives on Enterobacter for the infection control professional. **American Journal of Infection Control**, v. 22, n. 4, p. 195–201, ago. 1994.

CLARKE, R. M.; CUMMINS, E. Evaluation of “Classic” and Emerging Contaminants Resulting from the Application of Biosolids to Agricultural Lands: A Review. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 21, n. 2, p. 492–513, 17 fev. 2015.

CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

CORRÊA, I. M. DE O. **Enterobactérias e fatores de virulência em cepas de escherichia coli isoladas de psitacídeos.** Santa Maria, RS: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2012.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

DAI, X. et al. Melatonin ameliorates the fertilization capacity of oocytes exposed to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. **Reproductive Toxicology**, v. 93, p. 61–67, abr. 2020.

DAN LIU et al. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 222–229, jun. 2017.

DING, G. et al. A time-trend ecological study for identifying flood-sensitive infectious diseases in Guangxi, China from 2005 to 2012. **Environmental Research**, v. 176, p. 108577, set. 2019.

ETERNA DA COSTA, M.; MACHADO, H. S. Evolution of Antimicrobial Resistance in Europe: A Factual Review. **Journal of Allergy & Therapy**, v. 08, n. 01, p. 1–14, 2017.

FONSECA, T. G. **Perfil da comunidade de enterobactérias em trechos propensos a alagamentos do rio dos queimados em Concórdia, SC.** Concórdia

SC: Universidade do Contestado, 2018.

FRANKS, C. G. Phytoremediation of pharmaceuticals with *SALIX EXIGUA*. **University of Lethbridge Research Repository**, p. 1–216, 2006.

FREESTONE, P. P. et al. Growth Stimulation of Intestinal Commensal *Escherichia coli* by Catecholamines: A Possible Contributory Factor in Trauma-Induced Sepsis. **Shock**, v. 18, n. 5, p. 465–470, nov. 2002.

FREESTONE, P. P. E. et al. The Mammalian Neuroendocrine Hormone Norepinephrine Supplies Iron for Bacterial Growth in the Presence of Transferrin or Lactoferrin. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 6091–6098, 1 nov. 2000.

FUTRAN FUHRMAN, V.; TAL, A.; ARNON, S. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 589–611, abr. 2015.

GALÁN, A. C. **Klebsiella pneumoniae multirresistente: un problema de salud pública. estudio de su presencia en el hospital general universitario de alicante**. [s.l.] Universidad de Alicante, 2016.

GANESWIRE, R.; THONG, K. L.; PUTHUCHEARY, S. D. Nosocomial outbreak of *Enterobacter gergoviae* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 4, p. 292–296, abr. 2003.

GARCIA, V. et al. *Citrobacter amalonaticus* human urinary tract infections, Marseille, France. **New Microbes and New Infections**, v. 11, p. 1–5, maio 2016.

GHENGHESH, K. S. et al. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 2, p. 81, 2008.

GODON, C. et al. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22480–22489, 1998.

GOWRISANKAR, G. et al. Chemical, microbial and antibiotic susceptibility analyses of groundwater after a major flood event in Chennai. **Scientific Data**, v. 4, n. 1, p. 170135, 10 dez. 2017.

GUILBAULT, C. et al. Influence of gender and interleukin-10 deficiency on the inflammatory response during lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. **Immunology**, v. 107, n. 3, p. 297–305, nov. 2002.

GÜMÜŞ, D. et al. The roles of hormones in the modulation of growth and virulence genes' expressions in UPEC strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 319–324, jul. 2019.

HAMILTON, P. B. et al. Effects of Exposure to WwTW Effluents over Two Generations on Sexual Development and Breeding in Roach *Rutilus rutilus*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 21, p. 12994–13002, 3 nov. 2015.

HAYES, S. L. et al. Evaluating virulence of waterborne and clinical *Aeromonas* isolates using gene expression and mortality in neonatal mice followed by assessing



cell culture's ability to predict virulence based on transcriptional response. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 811–820, out. 2007.

HERNANDO, M. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n. 2, p. 334–342, 15 abr. 2006.

HIGGINS, J.; HOHN, C. Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 2, p. 259–266, mar. 2008.

HORN, R. V. et al. Identification and antimicrobial resistance of members from the Enterobacteriaceae family isolated from canaries (*Serinus canaria*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 552–556, jun. 2015.

HU, Q. et al. *Salmonella enterica* Seroovar Senftenberg Human Clinical Isolates Lacking SPI-1. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1330–1336, 1 abr. 2008.

HUANG, B. et al. Effects and bioaccumulation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 169–176, fev. 2015.

ISHIGURO, S. Industries using arsenic and arsenic compounds. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 323–331, jul. 1992.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, jan. 2010.

JONES, S. B.; WESTFALL, M. V.; SAYEED, M. M. Plasma catecholamines during *E. coli* bacteremia in conscious rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 254, n. 3, p. R470–R477, 1 mar. 1988.

JONES, S. L.; BLIKSLAGER, A. T. Role of the Enteric Nervous System in the Pathophysiology of Secretory Diarrhea. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 222–228, maio 2002.

KAUR, H.; BALA, M.; BANSAL, G. Reproductive drugs and environmental contamination: quantum, impact assessment and control strategies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 26, p. 25822–25839, 23 set. 2018.

KIDD, K. A. et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KINNEY, K. S. et al. Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. **Microbial Pathogenesis**, v. 26, n. 2, p. 85–91, fev. 1999.

KITA, E. et al. Effect of estrogen (17 beta-estradiol) on the susceptibility of mice to disseminated gonococcal infection. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 1, p. 238–243, 1985.

KITA, E. et al. Alterations of Host Resistance to Mouse Typhoid Infection by Sex Hormones. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 46, n. 6, p. 538–546, dez. 1989.

KLEIN, A. M. et al. Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187–1201, maio 2015.

KLEIN, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 6, p. 627–638, ago. 2000.

KOŁODZIEJ, E. P.; SEDLAK, D. L. Rangeland Grazing as a Source of Steroid Hormones to Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 10, p. 3514–3520, maio 2007.

KORNMAN, K. S.; LOESCHE, W. J. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 1, p. 256–263, 1982.

LAVE, T. R.; LAVE, L. B. Public Perception of the Risks of Floods: Implications for Communication. **Risk Analysis**, v. 11, n. 2, p. 255–267, jun. 1991.

LENNETTE, E. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985.

LEONE, M. et al. Effect of Sex on *Coxiella burnetii* Infection: Protective Role of 17 $\beta$ -Estradiol. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 2, p. 339–345, 15 jan. 2004.

LI, Y. et al. Excretion of estrogens in the lives stock and poultry production and their environmental behaviors. **Acta ecologica sinica**, v. 30, p. 1058–1065, 2010.

LIEN, C.-Y. et al. Clinical characteristics of *Citrobacter meningitis* in adults: High incidence in patients with a postneurosurgical state and strains not susceptible to third-generation cephalosporins. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 54, p. 83–87, ago. 2018.

LITTLE, P. et al. Reducing risks from coronavirus transmission in the home—the role of viral load. **BMJ**, p. m1728, 6 maio 2020.

LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 567–577, jan. 2010.

LOPES, L. G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - SP**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007.

LYTE, M. et al. Norepinephrine Induced Growth and Expression of Virulence Associated Factors in Enterotoxigenic and Enterohemorrhagic Strains of *Escherichia coli*. In: **Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases**. [s.l: s.n.]. p. 331–339.

LYTE, M.; FRANK, C.; GREEN, B. Production of an autoinducer of growth by

norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, n. 2–3, p. 155–159, 1 jun. 1996.

MANDAL, D. et al. Isolation and Characterization of Multi-Drug Resistance *Proteus Vulgaris* From Clinical Samples of Uti Infected Patients From Midnapore, West Bengal. **International Journal of Life Science and Pharma Research**, v. 5, n. 2, p. L32–L45, 2015.

MARATHE, N. P. et al. Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. **Water Research**, v. 124, p. 388–397, nov. 2017.

MARK, O. et al. A new methodology for modelling of health risk from urban flooding exemplified by cholera - case Dhaka, Bangladesh. **Journal of Flood Risk Management**, v. 11, p. S28–S42, jan. 2018.

MARTINEZ-MURCIA, A. J. et al. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 91, n. 3, p. 199–205, mar. 1992.

MATOS, H. J. DE. A próxima pandemia: estamos preparados? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 3, p. 9–11, jan. 2018.

MATSUDA, H. et al. Inhibitory effect of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on bactericidal activity in uteri of rabbits infected with *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 48, n. 3, p. 652–657, 1985.

MONNET, D. L. et al. Evidence of Interhospital Transmission of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1986 to 1993. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 7, p. 492–498, jul. 1997.

MOREIRA, D. S. **Desenvolvimento da metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte**. Ouro Preto: Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

NAYAK, A. S.; LAGE, C. R.; KIM, C. H. Effects of Low Concentrations of Arsenic on the Innate Immune System of the Zebrafish (*Danio Rerio*). **Toxicological Sciences**, v. 98, n. 1, p. 118–124, 10 abr. 2007.

NIE, M. et al. Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary. **Chemosphere**, v. 127, p. 109–116, maio 2015.

NISHIKAWA, Y.; BABA, T. In vitro adherence of *Escherichia coli* to endometrial epithelial cells of rats and influence of estradiol. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 2, p. 506–509, 1985.

OLSEN, P. et al. Leaching of Estrogenic Hormones from Manure-Treated Structured Soils. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 11, p. 3911–3917, jun. 2007.

PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources:

Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, nov. 2010.

PATERSON, D. L. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 3, p. 473–478, 2000.

PITOUT, J. D. et al. Beta-lactamases and detection of beta-lactam resistance in *Enterobacter* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 35–39, jan. 1997.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1 out. 1998.

PROIA, L. et al. Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. **Science of The Total Environment**, v. 628–629, p. 453–466, jul. 2018.

PRÜSS-USTÜN, A. et al. Diseases due to unhealthy environments: an updated estimate of the global burden of disease attributable to environmental determinants of health. **Journal of Public Health**, v. 39, n. 3, p. 464–475, 1 set. 2017.

PUNG, O. J. et al. Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 1, p. 91–96, 1985.

RAMAKRISHNAN, B. et al. Local applications but global implications: Can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? **Science of The Total Environment**, v. 654, p. 177–189, mar. 2019.

ROBERTS, C. .; SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 382–388, out. 1996.

ROCHA, C. R. C. et al. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3631–3643, 2001.

RODRIGUEZ-NAVAS, C. et al. Biogas final digestive byproduct applied to croplands as fertilizer contains high levels of steroid hormones. **Environmental Pollution**, v. 180, p. 368–371, set. 2013.

ROSSI, E. et al. “It’s a gut feeling” – *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 1–30, 2 jan. 2018.

ROUTLEDGE, E. J. et al. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 11, p. 1559–1565, jun. 1998.

SAAVEDRA, M. J. et al. Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*.

**Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 2, p. 159–167, 14 fev. 2007.

SANTOS, J.; PERDUE, M. H. Stress and neuroimmune regulation of gut mucosal function. **Gut**, v. 47, n. SUPPL. 4, p. 49–51, 2000.

SCHLEICHER, A. T. **Remoção de estrona, estradiol, etinilestradiol e bisfenol-A por meio de nanofiltração aplicada ao tratamento avançado de águas para consumo humano**. Brasília: Universidade de Brasília, 2013.

SCOULLOS, I. M. et al. Inactivation of indicator organisms on different surfaces after urban floods. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135456, fev. 2020.

SETTINO, J. et al. Overview of solar technologies for electricity, heating and cooling production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 892–909, jul. 2018.

SHI, W. et al. The synergic impacts of TiO<sub>2</sub> nanoparticles and 17 $\beta$ -estradiol (E2) on the immune responses, E2 accumulation, and expression of immune-related genes of the blood clam, *Tegillarca granosa*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 81, n. June, p. 29–36, out. 2018.

SUWANSRINON, K. et al. Enteric fever-like illness caused by infection with *Citrobacter amalonaticus*. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 88, n. 6, p. 837–840, 2005.

USLU, H.; SENGUL, G.; AKTAS, O. A Rare Case Of Cranial Osteomyelitis Caused By *Proteus Vulgaris*. **Medical Journal of Trakya University**, v. 28, n. 1, p. 113–115, 2011.

VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 267–288, maio 2005.

VOETSCH, A. C. et al. Analysis of the FoodNet case-control study of sporadic *Salmonella* serotype Enteritidis infections using persons infected with other *Salmonella* serotypes as the comparison group. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 408–416, 9 mar. 2009.

VOM STEEG, L. G.; KLEIN, S. L. Sex Steroids Mediate Bidirectional Interactions Between Hosts and Microbes. **Hormones and Behavior**, v. 88, p. 45–51, fev. 2017.

VON SPERLING, M.; BASTOS, R. K. X.; KATO, M. T. Removal of *E. coli* and helminth eggs in UASB: Polishing pond systems in Brazil. **Water Science and Technology**, v. 51, n. 12, p. 91–97, 2005.

WILLIAMS, R. J. et al. A national risk assessment for intersex in fish arising from steroid estrogens. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 220, 2009.

WISE, A.; O'BRIEN, K.; WOODRUFF, T. Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water? †. **Environmental Science &**

**Technology**, v. 45, n. 1, p. 51–60, jan. 2011.

ZHANG, H. et al. Occurrence and removal of free estro-gens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in east China. **Water Res.**, v. 58, p. 248–257, 2014.

ZHANG, X. et al. Estrogen Effects on *Candida albicans*: A Potential Virulence-Regulating Mechanism. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 4, p. 1441–1446, abr. 2000.

ZOELLER, R. T. et al. Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, set. 2012.