



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

LEOVERGILDO RODRIGUES FARIAS

**CONTAMINANTES EMERGENTES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE
BACTÉRIAS A ANTIBACTERIANOS EM MICROBACIA DO RIO BRANCO,
RORAIMA, EXTREMO NORTE DO BRASIL**

Área de concentração: Manejo e
dinâmica de Recursos Naturais.

BOA VISTA, RR
2022

LEOVERGILDO RODRIGUES FARIAS

**CONTAMINANTES EMERGENTES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE
BACTÉRIAS A ANTIBACTERIANOS EM MICROBACIA DO RIO BRANCO,
RORAIMA, EXTREMO NORTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Recursos Naturais da Universidade Federal de
Roraima, para obtenção do título de doutor em
Ciências Ambientais (Recursos Naturais).

Orientador: Dr. Marcos José Salgado Vital.

Coorientadora: Dra. Ana Paula Folmer Correa.

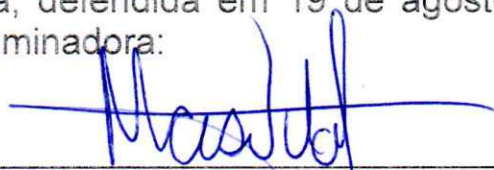
BOA VISTA, RR

2022

LEOVERGILDO RODRIGUES FARIAS

**CONTAMINANTES EMERGENTES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE
DE BACTÉRIAS EM UMA MICROBACIA DO RIO BRANCO,
RORAIMA, EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA**

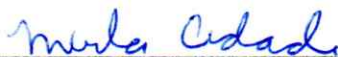
Tese apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Doutorado em Recursos Naturais (Ciências Ambientais) da Universidade Federal de Roraima, defendida em 19 de agosto de 2022 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Marcos José Salgado Vital
Orientador - Universidade Federal de Roraima/UFRR



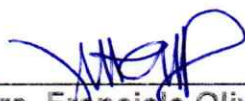
Profa. Dra. Daniele Sayuri Fujita Ferreira
Membro - Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Roraima/IFRR



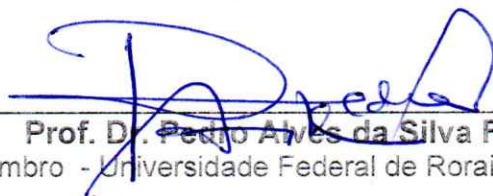
Profa. Dra. Miria Janaína Augusta Cidade
Membro - Universidade Federal de Roraima/UFRR



Profa. Dra. Fabiana Granja
Membro - Universidade Federal de Roraima/UFRR



Profa. Dra. Franciele Oliveira Campos da Rocha
Membro - Universidade Estadual de Roraima /UFRR



Prof. Dr. Pedro Alves da Silva Filho
Membro - Universidade Federal de Roraima/UFRR

Dedico ao professor Dr. Henrique Eduardo
Bezerra da Silva (*in memoriam*) e a mulher mais
bela de todas, Geralda Farias, pelos ensinamentos e
lições de vida.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é o sinônimo mais belo do agradecimento. Por isso, sejamos gratos a Deus que nos proporciona tudo. Ser grato é ter o sentimento mais nobre da vida, principalmente quando manifestamos este sentimento em distintas ocasiões e, na vida acadêmica, sou grato pela possibilidade de concluir esta tese de doutorado.

Inicialmente, devo expressar que nesse período de pandemia, estar vivo é motivo suficiente para agradecer e comemorar, pois tive muitas percas: parentes, amigos e colegas de profissão. Assim, sou grato a ciência que possibilitou o desenvolvimento de vacinas, elas salvam vidas! Mas, desenvolver ciência nesse período, principalmente com cortes orçamentários, nos enfraquece!

Nesse sentido, considero que foi uma ousadia pessoal e profissional fazer esse doutorado e mostrar os resultados desta tese. Isso é fazer ciência. Esses resultados, me permitiram compreender o verdadeiro significado das ciências ambientais, pois já não sou mais o mesmo. Caso fosse, não estaria fazendo um doutorado.

Foram tantos acontecimentos, os quais dariam para escrever um livro. Contudo, obstáculos existem e coadunam para termos um final feliz!

Portanto, sinto-me lisonjeado em agradecer:

Ao Professor Dr. Marcos José Salgado Vital, pela orientação, dedicação, estímulo e compreensão, fatos imprescindíveis para realização desta tese;

À Professora Dra. Ana Paula Corrêa Folmer, pela amizade, carisma, contribuições e pela coorientação fielmente concedida na elaboração da tese;

Ao Prof. Dr. Henrique Eduardo Bezerra da Silva (*in memoriam*), pela condução durante toda minha trajetória acadêmica;

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT) e a Universidade Federal de Roraima, pela oportunidade de crescimento intelectual;

Ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Feral do Rio Grande do Sul, em nome de Fabiana Torment e da professora Dra. Patrícia Valente pelas identificações das bactérias;

Ao Programa de Incentivo à Pesquisa Aplicada-Docente do Instituto Federal de Roraima (PIPAD-IFRR), por fomentar parte da pesquisa desenvolvida neste doutorado;

À Professora Dra. Lisiane dos Santos Freitas, pelas valiosas contribuições, amizade e por proporcionar a liberdade para realização de estágio no laboratório da Universidade Federal de Sergipe;

A minha família: Geralda Farias (mãe), Leonildo Farias (pai), Laina Farias, Leonildo Filho e Leonardo Farias, pela compreensão, dedicação, paciência, pelas palavras de incentivo, companheirismo e, acima de tudo, pelo amor;

Aos amigos: Andréia Alencar, Karla e Taylana dos Laboratórios de Microbiologia, Extração, Fermentação e de Ecotoxicologia do PRONAT, pelas valiosas contribuições e pelos momentos de distrações nos intervalos entre as análises;

À “grande” amiga Jordana Souza Paula Riss, pela confiança, dedicação e principalmente pela ajuda concedida em todos os momentos durante a realização desta tese;

Ao amigo e fraterno irmão que a vida me deu, Sthanly Rebouças Zielinski, pelas palavras de incentivo, por ser um parceiro fiel e por acreditar na minha capacidade;

Ao amigo e professor Dr. Pedro Pequeno, pelas contribuições estatísticas no transcorrer deste doutorado e, pelos momentos de descontrações;

Ao meu parceiro, Manoel Henrique, pelo companheirismo de sempre;

Aos que acreditaram em mim e se dispuseram a me ajudar em determinadas situações e nos obstáculos pandêmicos que tive que passar e superar para realização deste trabalho, sinceros agradecimentos.

Estar ciente que a Química é uma ciência filosófica é ter consciência de que a identificação ou a quantificação exata só poderão ser expressas como sendo as de maiores probabilidades. É muita pretensão imaginar que uma amostra de composição quase ou nada conhecida seja qualitativa ou quantitativa relatada em suas espécies, por apenas um sinal analítico isento de reflexão química.

(Flávio Leite, 2002)

RESUMO

As águas superficiais são os principais corpos receptores dos contaminantes emergentes e de bactérias resistentes a antibacterianos, pois recebem esgotos urbanos, hospitalares, industriais, o escoamento superficial, bem como o sistema de drenagem, tornando-se facilmente um meio propagador de doenças, ocasionando impactos à saúde e ao ambiente. Novas técnicas analíticas têm possibilitado investigar a ocorrência de contaminantes emergentes, como a cafeína e a amoxicilina, somadas a possibilidade de se avaliar o perfil de susceptibilidade de bactérias a antibacterianos, bem como a identificação dessas bactérias. Estudos como estes, ainda são escassos no Brasil, principalmente na região Amazônica. Diante disto, o objetivo desta pesquisa, pioneira na região, foi investigar a ocorrência dos contaminantes emergentes cafeína e amoxicilina e avaliar o perfil de susceptibilidade de bactérias a antibacterianos na microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo norte da Amazônia. Para tanto, utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV/DAD) para identificação da cafeína e da amoxicilina; o método de difusão em Ágar, para avaliar o perfil de susceptibilidade das bactérias e o método de Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/MS), bem como a Espectroscopia de Infravermelho Próximo (NIR) para identificação das bactérias resistentes. Os resultados deste estudo, estão distribuídos em três artigos que compõe esta tese, em que, de forma geral, demonstraram a presença de cafeína, considerada um indicador de contaminação por esgoto, e amoxicilina, indicadora de substâncias recalcitrantes, na microbacia do Rio Branco, sendo a cafeína detectada com maior frequência. Os resultados também revelaram a presença de bactérias resistentes, inclusive à amoxicilina, em alguns dos pontos estudados, sendo identificada a presença de bactérias que causam doenças de veiculação hídrica. Neste estudo, ficou evidente que a espectroscopia NIR, técnica rápida, precisa e não invasiva, permitiu identificar isolados de bactérias em amostras de águas superficiais, bem como agrupá-las conforme o tipo de Gram. Estes resultados apontam para a necessidade da continuação de estudos com os objetivos aqui propostos, monitorando os contaminantes emergentes, bem como, avaliando a presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos em ambientes aquáticos, de forma a contribuir para sustentabilidade ambiental, inclusive quanto a saúde da população.

Palavras-chave: Cafeína. Amoxicilina. Águas superficiais. Espectroscopia NIR. Resistência bacteriana. Amazônia.

ABSTRACT

Surface waters are the main receptors of emerging contaminants and antibacterial-resistant bacteria because they receive urban, hospital and industrial sewage, surface runoff, as well as the drainage system, easily becoming a means of spreading diseases, causing impacts to health and the environment. New analytical techniques have made it possible to investigate the occurrence of emerging contaminants, such as caffeine and amoxicillin, in addition to the possibility of evaluating the susceptibility profile of bacteria to antibacterials, as well as the identification of these bacteria. Studies like these are still scarce in Brazil, especially in the Amazon region. Therefore, the objective of this research, a pioneer in the region, was to investigate the occurrence of the emerging contaminants caffeine and amoxicillin and to evaluate the susceptibility profile of bacteria to antibacterials in the Rio Branco watershed, Roraima, in the extreme north of the Amazon. To this end, High Efficiency Liquid Chromatography with ultraviolet detector (HPLC-UVDAD) was used to identify caffeine and amoxicillin; the agar diffusion method was used to evaluate the susceptibility profile of bacteria and the Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/MS) method, as well as Near Infrared Spectroscopy (NIR) to identify resistant bacteria. The results of this study, are distributed in three articles that compose this thesis, in which, in general, they demonstrated the presence of caffeine, considered an indicator of contamination by sewage, and amoxicillin, an indicator of recalcitrant substances, in the Rio Branco watershed, with caffeine being detected more frequently. The results also revealed the presence of resistant bacteria, including to amoxicillin, in some of the studied points, being identified the presence of bacteria that cause waterborne diseases. In this study, it was evident that NIR spectroscopy, a fast, accurate and non-invasive technique, allowed the identification of bacterial isolates in surface water samples, as well as grouping them according to Gram type. These results point to the need for further studies with the objectives proposed here, monitoring emerging contaminants, as well as evaluating the presence of antimicrobial resistant microorganisms in aquatic environments, in order to contribute to environmental sustainability, including the health of the population.

Keywords: Caffeine. Amoxicillin. Surface water. NIR spectroscopy. Bacterial resistance. Amazon.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	EMERGING CONTAMINANTS CAFFEINE AND AMOXICILLIN IN A MICROBASIN OF THE BRANCO RIVER IN BOA VISTA, RORAIMA, EXTREME NORTH OF THE AMAZON.....	14
2.1	NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS NA REVISTA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL.....	30
3	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACTÉRIAS NA MICROBACIA DO RIO BRANCO, RORAIMA, EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA.....	40
4	GREEN AND FAST METHOD FOR IDENTIFYING SURFACE WATER BACTERIAL ISOLATES USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE ANALYSIS.....	56
4.1	NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS NA REVISTA <i>MOLECULES</i>	62
5	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O crescimento desordenado das cidades, aliado ao processo de industrialização, exige modelos que façam a conciliação entre o desenvolvimento econômico, a permanência da produtividade dos recursos naturais e a qualidade ambiental. Entretanto, a expansão das cidades traz consigo a degradação ambiental, que surge de uma anormalidade das civilizações marcada pela modernidade, na qual predomina a ampliação da razão tecnológica sobre como o ambiente está organizado.

Conservar o ambiente é fazer uso racional dos recursos naturais para garantir a disponibilidade dos recursos renováveis e o aprimoramento do uso dos recursos não renováveis. Desse modo, é possível assegurar a melhoria na qualidade de vida dos presentes e das futuras gerações. O uso dos recursos naturais, de forma responsável não é uma tarefa fácil, principalmente, no que se refere aos recursos hídricos. Desde os primórdios, as civilizações começaram a se estabelecer de forma estratégica nas margens dos cursos hídricos, fato observado no mundo inteiro. Neste sentido, a qualidade dos recursos ambientais se constituiu em uma categoria primordial de preocupação para pesquisadores e programas de pós-graduação, principalmente, após o surgimento da área de Ciências Ambientais da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A qualidade dos recursos hídricos é motivo de bem-estar do homem. Porém, a poluição desses recursos por contaminantes biológicos e químicos é um problema mundial, pois a maioria dos países possui águas poluídas por algum tipo desses contaminantes, inclusive os emergentes. A poluição fecal das águas para consumo humano ocasiona doenças e as águas poluídas por esgotos causam prejuízos para pessoas que não possuem alternativas, senão consumi-la.

Os contaminantes emergentes são definidos como substâncias químicas, de ocorrência natural ou antrópica, ou microrganismo que, geralmente, não são legislados para o ambiente. Entretanto, possuem forte potencial para entrar no ambiente, causando consequências desfavoráveis aos ecossistemas ou sobre a saúde humana, sendo esses efeitos desconhecidos ou suspeitos. São substâncias persistentes bioacumulativas e tóxicas, contaminantes orgânicos globais, bem como interferentes endócrinos (EPA, 2022).

Dentre as classes dos contaminantes emergentes, os fármacos como a cafeína e principalmente os antimicrobianos, merecem atenção especial. A cafeína e a amoxicilina tem sido alvo de várias pesquisas no Brasil e no mundo, em virtude de seu alto consumo, por possuírem baixa biodegradabilidade e por não se conhecer o efeito crônico da exposição em

seres humanos e animais. Apesar do alto consumo desses contaminantes, o uso de forma inadequada e indiscriminada desses antibacterianos torna mais rápido o processo natural de resistência das bactérias aos antibacterianos e contribui para o seu surgimento e disseminação no ambiente (SILVA, WOLFF, CARRISSIMI, 2022).

O crescimento desordenado das cidades, aliado ao aumento populacional, deficiente de saneamento básico e o surgimento de novos hábitos de consumo contribuem, de forma significativa, para lançar nos mananciais superficiais muitos desses contaminantes emergentes, resultantes de atividades antrópicas e que comprometem a qualidade dos recursos hídricos (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Na atualidade, os debates sobre a degradação dos recursos hídricos têm se concentrado muito mais nos grandes centros urbanos, pois o crescimento acelerado e desordenado desses centros torna a degradação dos recursos mais intensa e rapidamente perceptível. Contudo, pesquisas em cidades pequenas têm constatado a degradação dos seus recursos hídricos, ocasionados principalmente pela falta de planejamento municipal, aliado aos processos de invasões, ao despejo de resíduos sólidos e de efluentes, contaminando principalmente os mananciais superficiais.

No que concerne à degradação dos recursos hídricos, está inserido o município de Boa Vista, capital do Estado de Roraima, extremo norte do Brasil. Neste município, vem ocorrendo de forma acelerada e significativa uma degradação dos mananciais superficiais, ocasionada principalmente por ações antropogênicas. Tais degradações têm sido reportadas essencialmente no Igarapé Grande, no Rio Branco (FALCÃO, 2012; SATELLES et al., 2018) e no Igarapé Mirandinha (TONELLO et al., 2010), corpos hídricos que compõe uma das microbacias do Rio Branco, objetos deste estudo.

Desta forma, esta pesquisa teve como problema norteador a contaminação das águas da microbacia do Rio Branco por contaminantes emergentes. Assim, considerando os impactos ocasionados nesses recursos hídricos, tornou-se necessário realizar um diagnóstico da presença de contaminantes emergentes e avaliar o perfil de susceptibilidade de bactérias a antibacterianos em amostras de águas superficiais da microbacia.

Nesse sentido, essa pesquisa foi discutida considerando o contexto ambiental, espacial e temporal, uma vez que a área de estudo está inserida no município de Boa Vista, onde muitos que sobrevivem da atividade pesqueira, recorrem à área para obtenção dos seus pescados e parte da água destinada ao consumo humano é captada no Rio Branco.

Durante esta pesquisa sobre a qualidade da água desta microbacia do Rio Branco, muitos elementos foram abordados e estudados, principalmente: água, ambiente,

desenvolvimento, poluentes, contaminantes emergentes e perfil de susceptibilidade a antibacterianos. E considerando o ser humano como parte do ambiente, conceitua-se a categoria ambiente, como uma visão das relações complexas e sinérgicas gerada pela articulação dos processos de ordem física, biológica, termodinâmica, econômica, política e cultural (DULLEY 2004).

Para apresentar respostas ao problema norteador desta pesquisa foram feitas as seguintes arguições: os contaminantes emergentes cafeína e amoxicilina estão presentes na microbacia do Rio Branco? As bactérias presentes nas águas do Igarapé Grande, do Igarapé Mirandinha e do Rio Branco, que formam a microbacia em estudo, são resistentes aos antibacterianos? Em caso afirmativo de resistência, a quais antibacterianos e quais são essas bactérias?

Pelo contexto descrito, o objetivo geral desta pesquisa foi investigar a ocorrência dos contaminantes emergentes cafeína e amoxicilina e avaliar o perfil de susceptibilidade de bactérias a antibacterianos em amostras de águas da microbacia do Rio Branco, em Boa Vista, Roraima, extremo norte da Região Amazônica, pois conhecer a dinâmica do comportamento desses contaminantes emergentes nesses recursos hídricos é fundamental para prever riscos ao ambiente e a saúde pública.

Por sua vez, visando ampliar a disseminação do conhecimento, inclusive agilizando a elaboração da tese, bem como o processo de avaliação pelos membros da banca examinadora, o Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima (PRONAT-UFRR), permite que o discente apresente a tese no formato compacto, a partir dos artigos produzidos, conforme as normas para apresentação de trabalhos técnicos-científicos da UFRR, aprovada pela Resolução n.º 08/2017-CEPE/UFRR (UFRR, 2017).

Desta feita, esta tese é formada por três artigos, os quais estão organizados seguindo a sequência dos objetivos específicos, proporcionando uma melhor compreensão. Após cada artigo não publicado, estão dispostas as normas para submissão de cada revista científica, para qual o artigo foi submetido.

O primeiro artigo, intitulado “*Emerging Contaminants Caffeine and Amoxicillin in a Microbasin of the Branco River in Boa Vista, Roraima, Extreme North of the Amazon*”, teve o objetivo de investigar a cafeína e amoxicilina nas águas superficiais da microbacia do Rio Branco, em uma área adjacente à capital do Estado de Roraima, Boa Vista. Este artigo, foi submetido a Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, que apresenta Qualis A2, na área de Ciências Ambientais, conforme o quadriênio 2013-2016 do evento de classificação da Plataforma Sucupira. Nesta pesquisa, concluiu-se que os contaminantes emergentes cafeína e

amoxicilina estão presentes nas águas superficiais da microbacia, sendo a cafeína detectada e quantificada em maior frequência.

Para atender o segundo objetivo desta tese, foi elaborado o artigo “*Perfil de susceptibilidade de bactérias na microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo norte da Amazônia*”, cujo objetivo foi avaliar o perfil de susceptibilidades das bactérias isoladas da microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo norte da Amazônia. Este artigo foi publicado na Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, volume 12, número 10, outubro de 2021, que possui Qualis B1 em Ciências Ambientais. A conclusão desta pesquisa demonstrou que existem bactérias resistentes a antibacterianos, nas águas superficiais em alguns pontos da microbacia.

No terceiro artigo, escrito na modalidade *short communication*, intitulado “*Green and fast method for identifying surface water bacterial isolates using near-infrared spectroscopy and multivariate analysis*”, o objetivo foi utilizar a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e a análise multivariada para identificar os microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*, isolados a partir de amostras de águas superficiais da microbacia do Rio Branco, Boa Vista, Roraima, bem como agrupar cepas bacterianas certificadas, conforme o Gram. Esta comunicação científica será submetida para a revista *Molecules*, cujo Qualis de referência é A2 em Ciências Ambientais. Neste estudo, ficou evidente que espectroscopia NIR é uma técnica rápida, precisa e não invasiva, que possibilita identificar isolados de bactérias em amostras de águas superficiais, bem como agrupá-las conforme o tipo de Gram.

Esta pesquisa contribui para alertar os órgãos ambientais e à população sobre a presença de fármacos nas águas superficiais da microbacia do Rio Branco, o qual possui o ponto de captação da água destinada à abastecimento humano após tratamento à parte da população de Boa Vista.

2 “EMERGING CONTAMINANTS CAFFEINE AND AMOXICILLIN IN A MICROBASIN OF THE BRANCO RIVER IN BOA VISTA, RORAIMA, EXTREME NORTH OF THE AMAZON”

The screenshot displays the SciELO Author Dashboard for 'Engenharia Sanitária e Ambiental'. The main section is titled 'Manuscritos submetidos' (Submitted Manuscripts). A table lists one manuscript with the following details:

STATUS	ID	TÍTULO	CRIADO	SUBMETIDO
ADM: Rodrigues, Allan • Aguardando processamento pelo administrador	ESA-2022-0172	Emerging Contaminants Caffeine and Amoxicillin in a Microbasin of the Branco River in Boa Vista, Roraima, Extreme North of the Amazon Visualizar submissão	30-jun-2022	30-jun-2022

Below the table, there is a link: [Entrar em contato com o periódico](#)

The left sidebar contains the following navigation options:

- 1 Manuscritos submetidos >
- 1 Manuscritos dos quais sou coautor >
- Iniciar nova Submissão >
- Instruções herdadas >
- 5 e-mails mais recentes >

1 **Emerging Contaminants Caffeine and Amoxicillin in a Microbasin**
2 **of the Branco River in Boa Vista, Roraima, Extreme North of the**
3 **Amazon**

4
5 **Contaminantes Emergentes Cafeína e Amoxicilina em uma**
6 **Microbacia do Rio Branco em Boa Vista, Roraima, Extremo Norte**
7 **da Amazônia**

8
9 **Abstract**

10 This research aimed to investigate the occurrence of the emerging contaminants, caffeine and
11 amoxicillin, in the surface waters of the Branco River basin in the area adjacent to the capital
12 of the state of Roraima, Boa Vista. To investigate the occurrence of these emerging
13 contaminants, two campaigns were carried out during the dry and rainy season at seven
14 collection points, which were five points located on the Branco River, one point at the mouth
15 of the Mirandinha Creek and another point at the mouth of the Grande Creek. The detection
16 and quantification of the contaminants were performed using high-performance liquid
17 chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and ultraviolet (UV) spectrophotometry.
18 The results revealed the presence of caffeine in the range of 97 to 198 $\mu\text{g L}^{-1}$ and amoxicillin
19 in the range of 69 to 130.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the Branco River microbasin, with caffeine being detected
20 more frequently. The results also indicated that the contaminants were quantified in higher
21 concentrations at collection points P1 and P2, which receive the effluent from the municipal
22 sewage treatment system and, P5, which sometimes receives the raw sewage originating from
23 a sewage pumping station. This study demonstrates that these points are affected by the disposal
24 of these as well as other unstudied possible contaminants, thus indicating the need to investigate
25 emerging contaminants in the rivers and streams of Roraima in the far north of the Amazon,
26 Brazil.

27
28 **Keywords:** Emerging Pollutants. Chromatography. Sewage. Water Resources.
29

30 **Resumo**

31 A presente pesquisa teve como objetivo investigar a ocorrência dos contaminantes emergentes
32 cafeína e amoxicilina nas águas superficiais da microbacia do Rio Branco na área adjacente à
33 capital do Estado de Roraima, Boa Vista. Para investigar a ocorrência desses contaminantes
34 emergentes, foram realizadas duas campanhas compreendendo o período seco e chuvoso em
35 sete pontos de coletas, sendo cinco pontos localizados no Rio Branco, um ponto na foz do

1 Igarapé Mirandinha e outro ponto na foz do Igarapé Grande. A detecção e a quantificação dos
2 contaminantes foram realizadas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com
3 detector por absorção de radiação ultravioleta com arranjo de diodos (HPLC-UV-DAD). Os
4 resultados revelaram a presença de cafeína na faixa de 97 a 198 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de amoxicilina na faixa
5 de 69 a 130,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ na microbacia do Rio Branco, sendo a cafeína detectada com maior
6 frequência. Os resultados também indicaram que os contaminantes foram quantificados em
7 concentrações mais elevadas nos pontos de coletas P1 e P2, os quais recebem o efluente do
8 sistema de tratamento de esgoto do município e, P5, o qual recebe por vezes o esgoto bruto
9 originário de uma estação elevatória de esgoto. Este estudo é pioneiro em Roraima e demonstra
10 que esses pontos são impactados pelo descarte desses e de outros possíveis contaminantes não
11 estudados, assim sugerindo a necessidade de se investigar esses e outros contaminantes
12 emergentes nos rios e igarapés de Roraima no extremo norte da Amazônia, Brasil.

13

14 **Palavras-chave:** Contaminantes Emergentes. Cromatografia. Esgoto. Recursos Hídricos.

15

16 **1 INTRODUCTION**

17

18 Emerging contaminants are chemical substances that are naturally occurring or of
19 anthropogenic origin. In addition to these, some microorganisms and toxins produced by algae
20 are also considered emerging contaminants. These compounds tend to present some risk to the
21 ecosystem, and are not included in routine monitoring programs, i.e., they are not included in
22 environmental laws. They are persistent, bioaccumulative and toxic substances, which comprise
23 global organic contaminants as well as endocrine disruptors (EPA, 2018).

24 Researchers from different countries have studied the presence of emerging contaminants in different
25 environmental matrices such as soils and sediments (KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2008; KIM *et al.*,
26 2007; ROBERTS *et al.*, 2006; ZUCCATO *et al.*, 2010), in domestic sewage, sewage treatment
27 plant (STP) effluents, in groundwater, in surface springs, in seawater (FEKADU *et al.*, 2019;
28 BALAKRISHNA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2016; RIVERA-JAIMES *et al.*, 2018;
29 FERNANDES *et al.*, 2020; KOREKAR *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2016) and also in
30 drinking water intended for human consumption (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA,
31 2017).

32 In the class of emerging contaminants, pharmaceuticals are the most researched in the
33 world, since they are constantly released into the environment in high quantities. Many of them
34 are persistent and some are lipophilic, thus making their bioaccumulation possible, while others

1 are generally metabolized by the body and their metabolites released into the environment,
2 which can affect aquatic biota and humans (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

3 Caffeine and amoxicillin have been the target of several studies in Brazil and around
4 the world, due to their high consumption and low biodegradability and because it is impossible
5 to know the chronic effects of exposure in humans and animals (COSTA JUNIOR; PLETSCHE;
6 2014).

7 Caffeine detected in waterbodies has been reported worldwide as an indicator of
8 contamination as a result of untreated domestic sewage (BEGA *et al.*, 2021). Currently, this
9 compound is described as the most frequently occurring emerging contaminant in surface water
10 samples collected in rivers that form the Amazon River estuary and its mangroves (CHAVES
11 *et al.* 2020). This substance is present in many plant species and is consumed in the Amazon
12 especially in the form of coffee, cocoa, açaí and guaraná (BERNEGOSI *et al.*, 2021;
13 KOREKAR *et al.*, 2020).

14 According to the WHO report on surveillance of antibiotic consumption, amoxicillin is
15 the most used drug in the world, making evident the continuity of the use of this compound
16 (WHO, 2018). Such consumption results in the constant frequency with which amoxicillin has
17 been detected in aquatic environmental matrices such as wastewater from sewage treatment
18 plants, (MINH *et al.*, 2009; WATKINSON *et al.*, 2009), hospital effluents (LIEN *et al.*, 2016),
19 in surface water (LOCATELLI; SODRE; JARDIM, 2011; YIN *et al.*, 2010), in seawater
20 (MINH *et al.*, 2009) and even in water intended for human consumption (MINH *et al.*, 2009),
21 in countries such as the United States, Brazil, and throughout Europe.

22 The northern region of Brazil occupies 45.3% of the Brazilian territory, and has about
23 18.6 million inhabitants, with the majority of the population concentrated in the state capitals
24 (IBGE, 2021). However, this region has the lowest rates of basic sanitation in the country. This
25 fact favors the contamination of water resources, mainly due to inefficient sewage treatment
26 and disorderly exploitation of natural resources (BERNEGOSI *et al.*, 2021).

27 The north of Brazil also has an abundance of natural resources, mainly water resources,
28 which include a significant number of surface springs, consisting mainly of the Amazon, Negro,
29 Solimões and Branco Rivers. The latter passes through the state of Roraima, and is the most
30 important waterbody and receiver of the sewage treatment plant in the municipality of Boa
31 Vista, which is the capital of the state (SATELLES *et al.*, 2018).

32 According to Nascimento and Araújo (2014), there is a need to develop studies
33 regarding contaminants in different aquatic environments, especially in the northern region of
34 Brazil. The realization of these studies will promote the monitoring and regulation of these

1 emerging contaminants by the relevant agencies (MONTAGNER *et al.*, 2017) because,
2 according to Sehonova *et al.* (2018), the monitoring of this category in aquatic environments
3 has become a priority for government agencies and regulatory agencies.

4 According to Singh *et al.* (2019), the dispersion of antimicrobial residues and other
5 emerging contaminants in water resources requires immediate attention. Such contaminants are
6 being discarded from sewage treatment plants and are not monitored by analytical techniques
7 that would allow the identification and quantification of these compounds in aquatic matrices.
8 However, some separation methods, such as gas chromatography and high-performance liquid
9 chromatography coupled to different detectors, such as mass spectrometry, fluorescence and
10 ultraviolet detectors, have made it possible to detect and quantify many emerging contaminants
11 in water resources and other environmental metrics, even at low concentrations. Such methods
12 make it possible to monitor these contaminants (LIMA *et al.*, 2017; NOGUERA-OVIEDO and
13 AGA, 2016).

14 Formed by the confluence of the Tacutu and Uraricoera Rivers, the Branco River is
15 located in the state of Roraima, in the extreme north of the western Amazon, with the capital
16 Boa Vista strategically established on its banks (PEREIRA *et al.*, 2010). Boa Vista is the most
17 populous municipality in the state and, according to IBGE estimates (2020), of the
18 approximately 613,000 inhabitants, 419,652 live in the capital. The Branco River is responsible
19 for supplying water to part of the city and, currently, receives the effluent from the sewage
20 treatment plant (SATELLES *et al.*, 2018).

21 Of the water resources that form the microbasin of the Branco River, in the urban area
22 of the city of Boa Vista, the Grande Creek and the Mirandinha Creek stand out. The Grande
23 Creek still receives part of the effluent generated in the treatment of sewage by the system of
24 stabilization ponds; the Mirandinha Creek runs through some neighborhoods of the capital and
25 flows into the Branco River, whose mouth is located upstream of the point of water capture
26 made by the Water and Sewage Company of Roraima (CAER). After treatment, the water is
27 distributed for human consumption. In much of its course, the Mirandinha Creek is canalized,
28 and this has caused problems such as the accumulation of garbage, sewage release and silting
29 (TONELLO *et al.*, 2010).

30 Thus, considering the current problem of emerging contaminants in the Amazon and the
31 importance of Branco River and streams for the population of the state of Roraima, especially
32 for the capital Boa Vista, the objective of this study was to investigate the occurrence of the
33 emerging contaminants, caffeine and amoxicillin, in the Branco River, Mirandinha Creek and
34 Grande Creek, in the area adjacent to the capital Boa Vista.

1 2 METHODOLOGY

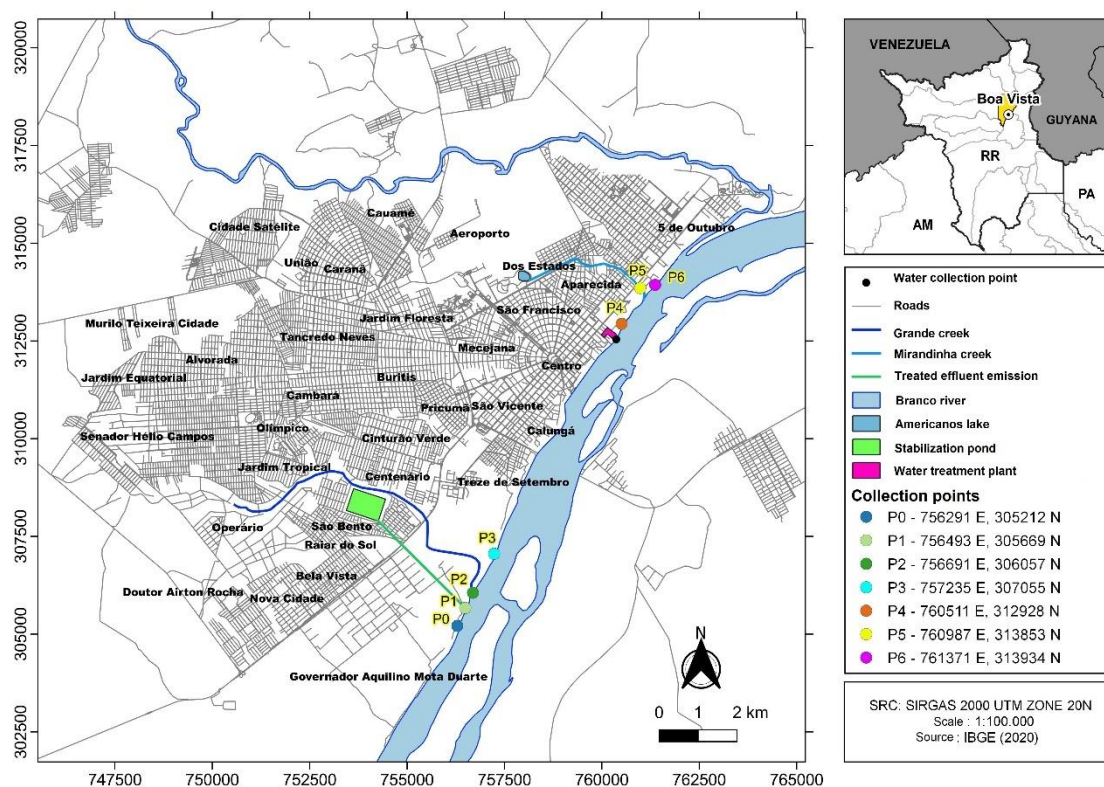
2 2.1 Study area and sampling procedure

3

4 The study was developed in the microbasin of the Branco River, and the collection
5 points are characterized in the following ways: Point 0, located on the Branco River and 800
6 meters downstream from the discharge of effluent from the sewage treatment plant (STP); Point
7 1, located on the Branco River in the discharge of effluent from the STP; Point 2, located at the
8 mouth of the Grande Creek; Point 3, located about 500 meters upstream from the effluent
9 discharge of the STP; Point 4, located about 2 meters above the point of capture of the water
10 that, after treatment by CAER, is destined to supply a part of the population of Boa Vista; Point
11 5, located at the mouth of the Mirandinha Creek and Point 6, located about 800 meters upstream
12 from the mouth of the Mirandinha Creek with the Branco River. The collection points, seen in
13 Figure 1, were chosen in such a way that this study evaluates the presence of emerging
14 contaminants, caffeine and amoxicillin, in order to predict the dispersion of these and other
15 contaminants in the microbasin.

16 The samples were collected in surface water, at a depth of about 30 cm below the
17 surface, using sterile 1 L amber vials. After the collections, the vials were stored and transported
18 under refrigeration, until the moment of analysis (NBR 9897) at the Ecotoxicology Laboratory
19 of the Graduate Program in Natural Resources of the Federal University of Roraima. Two
20 collections were carried out, one in September (rainy season) and another in December (dry
21 season).

22 The results were analyzed using descriptive statistics in order to synthesize values, thus
23 allowing us to achieve a global view of the variations in these values. This type of statistic
24 organizes and describes the data using tables, graphs and descriptive measures.



1
2 **Figure 1** - Location of collection points in the microbasin of the Branco River, RR, Brazil.

3 Source: Farias *et al.* (2021)

4
5 **2.2 Solvents, analytical standards and sample preparation**

6
7 All solvents used in the determination and quantification of the caffeine and amoxicillin
8 were of analytical purity and suitable for chromatographic analysis (HPLC-UV grade). The
9 water used was ultrapure and was obtained through a Milli-Q system (Millipore). The caffeine
10 and amoxicillin standards used were from Sigma Aldrich[®], and were of 99% purity.

11 The samples, collected in duplicate for each point, were filtered using glass fiber
12 membranes with 0.47 μm porosity (GF/F, Whatman) in order to remove the suspended material.
13 To obtain the extracts, the solid phase extraction technique was used (SPE), with a C18
14 cartridge composed of octadecyl 18% and 500 mg silica, in which the cartridges were
15 conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of ultrapure water. After conditioning, the
16 samples were processed and, then, after drying of the cartridges, the alanites were eluted with
17 1 mL of a methanol/water solution (30:70). For this purpose, a manifold with a capacity of
18 twelve cartridges was used, which was coupled to a vacuum pump with a flow rate of 3 mL
19 min^{-1} (GONÇALVES, 2017). The final extracts were filtered with a 0.45 μm filter and stored

1 in vials for analysis. This technique aimed to pre-concentrate the analytes (caffeine and
2 amoxicillin) contained in each 1-liter sample of water (SODRÉ *et al.*, 2010).

3 2.3 Chromatographic analyses

4
5
6 The quantitative analyses were performed using external standards and the calibration
7 curves were prepared using concentrations of 0.05; 0.10; 0.20; 0.6; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mg L⁻¹,
8 which were carried out with a methanol/water solution (30:70).

9 The limit of detection (LoD) and the limit of quantification (LoQ) were determined
10 based on the parameters of the analytical curves.

11 In the chromatographic analysis of the samples for the presence of caffeine and
12 amoxicillin, a high-performance liquid chromatography-diode array detection (Shimadzu
13 Proeminence) (HPLC-DAD) and ultraviolet spectrophotometry (UV SPD-M20A), with LC-
14 20AT pumps.

15 Chromatographic separation was performed using a C18 column with a stationary phase
16 (Shimadzu Shim-pack FC-ODS), with dimensions of 150 × 4.6 mm and a particle size of 3 µm.
17 The injection volume was 10 µL, and the sample was subjected to isocratic elution with
18 methanol/water in the ratio of 30:70 (v/v), at a flow of 1.0 mL.min⁻¹ and detection at
19 wavelengths of 230 and 273 nanometers (GONÇALVES, 2017).

20 21 3 RESULTS AND DISCUSSION

22
23 The results of the injections of the standards allowed us to identify the chromatographic
24 peaks of the emerging contaminants evaluated, with the peak of caffeine observed at the
25 retention time of 3.7 minutes and amoxicillin at 5.7 minutes.

26 The limit of detection and limit of quantification obtained via the parameters of the
27 analytical curves were, respectively, 0.03 mg L⁻¹ and 0.064 mg L⁻¹ for caffeine and 0.018 mg
28 L⁻¹ and 0.032 mg L⁻¹ for amoxicillin. These values are within the minimum and maximum
29 values chosen in the calibration curves.

30 To evaluate the accuracy of the method employed, a sample was fortified with standards
31 of the emerging contaminants analyzed at three concentration levels, these being 0.6, 1.0 and
32 1.5 µg L⁻¹. The results obtained in the recoveries of these fortification values were 87, 90 and
33 96%, respectively, for the concentrations fortified with the caffeine standard, and 79, 83 and
34 90% for the fortifications with amoxicillin. Thus, the values obtained in the recovery tests were

1 satisfactory since, according to Lanças (2004), the acceptable recovery range is from 70 to
2 120%.

3 The results of the chromatographic analyses performed in this study, as well as the limits
4 of detection and quantification and the calibration curves ($Y = ax + b$), are shown in Table 1.

5 **Table 1** - Results of the identification and quantification of caffeine and amoxicillin.

Emerging contaminant	Collection point	Season (concentration in $\mu\text{g L}^{-1}$)	
		Dry	Rainy
Caffeine LoD = 0.03 mg L ⁻¹ LoQ = 0.064 mg L ⁻¹ $y = 4.956x + 1.9$ $r^2 = 0.998$	P0	ND	<LQ
	P1	140	198
	P2	108	232
	P3	97	125
	P4	<LQ	86
	P5	198	176
	P6	ND	ND
Amoxicillin LoD = 0.018 mg L ⁻¹ LoQ = 0.032 mg L ⁻¹ $y = 2.167x + 6.31$ $r^2 = 0.996$	P0	ND	ND
	P1	104	69
	P2	130.4	87
	P3	ND	ND
	P4	ND	ND
	P5	79.2	ND
	P6	ND	ND

6 ND = Not detected, LoQ = Limit of quantification, LoD = Limit of detection

7

8 According to Table 1, the results show that, in both seasons, it was possible to detect
9 and quantify caffeine in almost all collection points except P6. These results ranged from 97 to
10 198 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the dry season and from 86 to 232 $\mu\text{g L}^{-1}$ (higher range of values) in the rainy
11 season, which is contrary to Wilkinson *et al.* (2017), who state that rainfall favors the dilution
12 factor, thus decreasing the concentration of drugs in waterbodies during rainy periods. It is
13 observed that the highest values for caffeine concentration were obtained in points P1, P2 and
14 P5, in the two campaigns carried out.

15 The high values obtained in the collection points, as previously described, can be
16 attributed to the release of effluents from the sewage treatment system in the municipality of
17 Boa Vista, since point P1 is located in the area in which the effluent mixes with the Branco
18 River. Regarding the collection point P2, it can be inferred that the values obtained can also be
19 associated with the wastewater from the STP because, during the collections, it was observed
20 that the release of the effluent in this period was not only at P1, but also at P2, especially when
21 the sewage level of the stabilization pond was high. Thus, the existence of a system of
22 floodgates was observed, which release the effluent into the Grande Creek to probably lower
23 the level of the lake. These facts were photographed, since the self-purification capacity of this
24 waterbody is lower in relation to the Branco River (SATELLES *et al.*, 2018).

1 In relation to collection point P5, the release of raw sewage into the Mirandinha Creek,
2 near its mouth, from the sewage treatment system pumping station was investigated. According
3 to Gonçalves *et al.* (2017), caffeine has been considered an indicator of sewage contamination,
4 and there is a significant relationship between its concentrations and the domestic sewage that
5 is discharged. Thus, the high results found here corroborate with those found by these authors.

6 The highest concentrations of caffeine, observed at collection points P1, P2 and P5,
7 support findings of Sehonova *et al.* (2018), Wilkinson *et al.* (2017) and Fernandes *et al.* (2020),
8 since they state that the appearance of emerging contaminants, especially drugs in ecosystems,
9 are mainly derived from sewage treatment systems and their effluents.

10 Also according to Table 1, in the two seasons studied, the presence of caffeine was
11 observed at collection point P3. It can be inferred that the presence of this compound in this
12 sampled point is due to its location being below the outflow of the Pricumã Creek, a fact that
13 was observed after the collections were performed. On subsequent visits, it was found that this
14 creek permeates a large part of the city and receives direct discharges of domestic sewage from
15 residences located on its margins.

16 According to Table 1, the values of the quantification of the caffeine analyzed at point
17 P4 was lower than the quantification limit in the dry season, and was $86 \mu\text{g L}^{-1}$ in the rainy
18 season. This observation becomes worrying because this point is located only 2 meters above
19 the point of capture of water that is destined, after treatment, for consumption by the part of
20 the population of Boa Vista, thus demonstrating the need for the development of studies aimed
21 at evaluating the presence of caffeine in water intended for human consumption in this
22 municipality.

23 The presence of caffeine at point P6 was not detected in the study. Such results may be
24 associated with the fact that this point is located in the Branco River, where there is no direct
25 release of domestic sewage and drainage system networks of the municipality of Boa Vista
26 (FARIAS *et al.*, 2021).

27 According to Rico *et al.* (2021), about 90% of the wastewater originating from the areas
28 of urban centers are released without treatment in the freshwater ecosystems of the Amazon
29 region. This fact supports the need for improvements in sanitation systems in the urban centers
30 of the Brazilian Amazon and the development of monitoring studies aimed at quantifying the
31 levels of drug concentrations and their risks to the biodiversity of Amazonian waters
32 (FABREGAT-SAFONT *et al.*, 2021).

33 In view of the above, the results for the quantification of caffeine obtained in this study
34 corroborate the work developed by Fabregat-Safont *et al.* (2021), who published the results of

1 the largest study of emerging contaminants carried out in the Amazon region along the Amazon
2 River and its three major tributaries: the Negro, Tapajos and Tocantins Rivers, and also in four
3 metropolises of the region: Manaus, Santarém, Macapá and Belém. The results revealed that
4 the Amazon and Tapajós Rivers, as well as their tributaries, are contaminated with emerging
5 contaminants, mainly by pharmaceuticals, with caffeine and cocaine being quantified in higher
6 concentrations, followed by analgesics, antihypertensive drugs and antibiotics. The study also
7 showed that, in urban streams, concentrations are higher than those found in rivers, in fact,
8 about a hundred times. In this study, the rivers of the state of Roraima, in the extreme north of
9 the Amazon, were not included.

10 The results found here also support the results of the study developed by Wilkinson *et*
11 *al.* (2022). In their research, the authors assessed environmental exposure to active
12 pharmaceuticals in 258 rivers in 104 countries. The results revealed that caffeine was frequently
13 detected in more than half of the monitored sites. Similar values were also found by Archana *et*
14 *al.* (2017), who evaluated the seasonal variation of five pharmaceuticals (acetaminophen,
15 ciprofloxacin, caffeine, irgasan, and benzophenone) in tributary and effluents of a sewage
16 treatment plant in six large lakes, in and around Nagpur, Central India. The results of the
17 chromatographic analyses revealed concentrations in the range of 1 to 174 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the surface
18 of the waterbodies, 12 to 373 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the tributary and 11 to 233 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the effluent of the
19 STP. Among the five emerging contaminants studied, caffeine was found in higher
20 concentrations when compared to the others.

21 Gonçalves *et al.* (2017) found caffeine concentrations of 47 $\mu\text{g L}^{-1}$ in a survey conducted
22 in the Panquequer River, in the city of Teresópolis, Rio de Janeiro, Brazil. The results obtained
23 by the authors showed a positive relationship between caffeine, phosphate, nitrate and
24 ammonium concentrations and an increased effluent load, thus demonstrating that caffeine can
25 be used as an indicator of pollution of surface water by domestic effluents.

26 It is important to emphasize that the Environmental Company of the State of Sao Paulo
27 (CETESB) already performs the determination of caffeine levels in some monitoring points,
28 including in rivers and reservoirs (CETESB, 2020). However, the Water and Sewage Company
29 of Roraima does not use the determination of caffeine as an indicator of environmental
30 contamination.

31 For the emerging contaminant amoxicillin, the results in Table 1 show that this
32 contaminant was detected only at the collection points P1, P2 and P3. In the other points, in the
33 two campaigns carried out, amoxicillin was not detected.

1 In this study, the highest concentrations were detected respectively at points P1, P2 and
2 P3 in the dry season. These values are considered high when compared to the study conducted
3 by Hijosa-Valsero *et al.* (2011), who developed their research in the effluent of a STP and
4 found values from 12 to 30 $\mu\text{g L}^{-1}$. The values found here contradict the study by Unutkan,
5 Bakirdere and Keyf (2018), who developed an analytical method for the determination of
6 amoxicillin in commercial drugs and in wastewater samples. In their results, the authors did not
7 find amoxicillin in the wastewater samples.

8 Oliveira *et al.* (2015) developed and validated an analytical method using HPLC-UV to
9 determine amoxicillin levels in the Água Fria and Verruga Rivers, located in the southwest of
10 Bahia state in Brazil. According to the authors, the results reveal the levels of contamination of
11 rivers by this contaminant. The highest concentrations, above 11 mg L^{-1} , were quantified in the
12 areas that receive urban surface runoff. These values resemble the values found here.

13 For Silva, Wolff and Carissimi (2022), the increase in pollution generated by
14 anthropogenic activities, such as the release of effluents, whether as they are or partially treated,
15 in water resources that are receiving bodies, has caused severe damage to the environment. In
16 these effluents, pharmaceutical products cause great concern, since many are resistant to
17 conventional treatment. This conventional treatment is also used by the sewage treatment
18 system of the Municipality of Boa Vista.

19 In this regard, antibacterial drugs generate a greater concern in environmental issues,
20 with amoxicillin standing out in this study, since according to the WHO, it is one of the most
21 used in Brazil and in the rest of the world (WHO, 2018).

22 The results found here for the emerging contaminant amoxicillin support the results
23 published by Farias *et al.* (2021) regarding the susceptibility profile of bacteria in the Branco
24 River microbasin, in which the authors found amoxicillin-resistant bacteria in the same
25 collection points of the Branco River microbasin, thus revealing the spread of this emerging
26 contaminant in the study site.

27 28 **4 CONCLUSIONS**

29
30 The results obtained from the quantification of caffeine and amoxicillin allow us to infer
31 that there are significant differences in caffeine concentrations between the collection periods,
32 and also reveal that there are higher concentrations for this emerging contaminant in the rainy
33 season, especially in the points that suffer the impact of effluent discharge from sewage
34 treatment systems.

1 This study demonstrated greater detection and quantification for caffeine when
2 compared to amoxicillin, which was predictable, since caffeine is present in the formulation of
3 different food products and various beverages that are commonly ingested by the population of
4 the city of Boa Vista. However, the data obtained in the quantification of concentrations of
5 amoxicillin are worrisome, since they reveal the impacts suffered by the microbasin of the
6 Branco River in the investigated points, and favor the phenomenon of bacterial resistance.

7 It is necessary to continue studies that aim to evaluate the presence of these and other
8 emerging contaminants in this microbasin of the Branco River, as well as in the creeks located
9 in the municipality of Boa Vista and also make the association of the presence of caffeine with
10 the determination of physical-chemical parameters that are associated with the impact generated
11 by domestic sewage in the microbasin of the Branco River and in the creeks.

12

13 **5 REFERENCES**

14

15 ANDREOZZI, R. *et al.* Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and
16 Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environmental Science &*
17 *Technology*, Easton, v. 38, n. 24, p. 6832 - 6838, 2004.

18

19 ARCHANA, G.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Ecotoxicological risk assessment and
20 seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment
21 plant and surface water bodies (lakes). *Environmental Monitoring and Assessment*, Dordrecht,
22 v. 189, n. 446, p. 1-18, 2017.

23

24 BALAKRISHNA, K. *et al.* A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care
25 products in Indian water bodies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Dordrecht, v. 137,
26 p. 113- 120, 2017.

27

28 BEGA, J. M. M. *et al.* Uso da cafeína como indicador de poluição por esgoto doméstico em
29 corpos d'água urbanos. *Engenharia Sanitaria e Ambiental [online]*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2,
30 p. 381-388, 2021.

31

32 BERNEGOSSI, A. C. *et al.* Contaminação emergente de cafeína em ambientes tropicais:
33 aspectos ecotoxicológicos aplicados à gestão dos recursos hídricos. Cutrim, André Carvalho.
34 *Gestão Ambiental nos Trópicos Úmidos: Impactos das Ações Humanas nos Recursos Naturais*
35 *das Fronteiras Amazônicas*. Guarujá, Editora Científica, p. 277-300, 2021.

36

37 CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Qualidade das*
38 *águas interiores no estado de São Paulo 2017*. São Paulo: CETESB, 301 p., 2018.

39

40 CHAVES, M. J. S. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products in a Brazilian wetland of
41 international importance: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total*
42 *Environment*, Amsterdam, v. 734, p. 1-11, 2020.

43

- 1 COSTA JUNIOR, I. L.; PLETSCH, A. L.; TORRES, Y. R. Ocorrência de Fármacos
2 Antidepressivos no Meio Ambiente – Revisão. *Revista Virtual de Química*, Rio de Janeiro, v.
3 6, n. 5, p. 1408-1431, 2014.
4
- 5 FABREGAT-SAFONT, D. *et al.* Triagem ampla de produtos farmacêuticos, drogas ilícitas e
6 seus metabólitos no rio Amazonas. *Water Research*, New York, v. 200, p. 117251, 2021.
7
- 8 FEKADU, S. *et al.* Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: a comparison of the
9 African and European challenge. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 654, p. 324-
10 337, 2019.
11
- 12 FERNANDES, A. S. *et al.* Impacts of discarded coffee waste on human and environmental
13 health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Dordrecht, v. 141, p. 30-36, 2017.
14
- 15 FERNANDES, M. J. *et al.* Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and
16 sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere*, Oxford, v. 239, n. 1. P. 1 – 12, 2020.
17
- 18 GONÇALVES, E. S. *et al.* The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater
19 contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. *Revista*
20 *Ambiente & Água [online]*, Taubaté, v. 12, n. 2 p. 192-202, 2017.
21
- 22 HIJOSA-VALSERO, M. *et al.* Removal of antibiotics from urban wastewater by constructed
23 wetland optimization. *Chemosphere*, Oxford, v. 83, n. 5, p. 713-719, 2011.
24
- 25 IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **CENSO DEMOGRÁFICO 2010:**
26 **características da população e dos domicílios: resultados do universo.** Sidra:
27 sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro, 2011.
28
- 29 INCTAA-INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS ANALÍTICAS
30 AVANÇADAS. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil.** São Carlos: Editora
31 Cubo, 2014.
32
- 33 KOREKAR, G.; KUMAR, A.; UGALE, C. Occurrence, fate, persistence and remediation of
34 caffeine: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, Exeter, v. 27, n. 3, p. 34715-
35 34733, 2020.
36
- 37 LIEN, L. T. Q. *et al.* Antibiotics in Wastewater of a Rural and an Urban Hospital before and
38 after Wastewater Treatment, and the Relationship with Antibiotic Use—A One Year Study
39 from Vietnam. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, Basel, v. 13, n. 6, p. 2 - 13, 2016.
40
- 41 LIMA, D. R. S. *et al.* Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e
42 técnicas de remoção. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 6, p. 1.043-
43 1.054, 2017
44
- 45 LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of Antibiotics in
46 Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass
47 Spectrometry. *Arch Environ Contam Toxicol*, New York, v. 60, p. 385 - 393, 2011.
48 MACHADO, K. C. *et al.* A preliminary nationwide survey of the presence of emerging
49 contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment*,
50 Amsterdam, v. 572, p. 138–146, 2016.

- 1 MINH, T. B. *et al.* Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and
2 fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, v. 58, n. 7, p. 1052 - 1062, 2009.
3
- 4 MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes
5 aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios.
6 *Química Nova*, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1094-110, 2017.
7
- 8 OLIVEIRA, C. M. R. M. *et al.* Validação de um método prático para determinação do teor de
9 amoxicilina em águas naturais por meio de HPLC-UV e sua aplicação na qualidade
10 ambiental. *R. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 74, n. 4, pág. 361-370, 2015.
11
- 12 ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* Relatório da OMS sobre vigilância do
13 consumo de antibióticos: implementação inicial de 2016-2018. Geneva: 128 p. 2018.
14
- 15 RICO, A. *et al.* Pharmaceuticals and other urban contaminants threaten Amazonian freshwater
16 ecosystems, *Environment International*, New York, v. 155, p. 106702, 2021
17
- 18 RIVERA-JAIMES, J. A. *et al.* Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from
19 Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the*
20 *Total Environment*, Amsterdam, v. 613-614, p. 1263-1274, 2018.
21
- 22 SATELLES, J. L. *et al.* avaliação dos impactos ambientais da estação de tratamento de esgoto
23 doméstico sobre o Igarapé Grande em Boa Vista/RR. *Periódico Tchêquímica*, Porto Alegre, v.
24 15, n. 30, p. 160 – 175, 2018.
25
- 26 SEHONOVA, P. *et al.* Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in
27 the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, Amsterdam, v. 631-632,
28 p. 789- 794, 2018.
29
- 30 SILVA, V. F.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Contaminação de efluentes por amoxicilina:
31 consequências ambientais e métodos de remoção. *Brazilian Journal of Science*, Rio Verde, v.
32 1, n. 2, p. 6-13, 2022.
33
- 34 SINGH, R. R. *et al.* Towards a harmonized method for the global reconnaissance of multi-class
35 antimicrobials and other pharmaceuticals in wastewater and receiving surface waters,
36 *Environment International*, New York, v. 124, p. 361-369, 2019.
37
- 38 SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants
39 in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air and Soil Pollution*, Dordrecht, v.
40 206, n. 1-4, p. 57-67, 2010.
41
- 42 TRAN, N. H. *et al.* Simultaneous analysis of multiple classes of antimicrobials in
43 environmental water samples using SPE coupled with UHPLC-ESI-MS/MS and isotope
44 dilution. *Talanta: an international journal of analytical chemistry*, London, v. 159, p. 163-173,
45 2016.
46
- 47 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. Contaminants of
48 Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Disponível em:
49 <http://www.epa.gov/esd/bios/pdf/contaminants-biosolids2.pdf>. Accessed 15 Mar. 2018.
50

- 1 UNUTKAN, T.; BAKIRDERE, S.; KEYF, S. Development of an analytical method for the
2 determination of amoxicillin in commercial drugs and wastewater samples, and assessing its
3 stability in simulated gastric digestion. *Journal of chromatographic science*, Niles, v. 56, n. 1,
4 p. 36-40, 2018.
5
- 6 WAGNER, M. C. *et al.* Ocorrência dos fármacos amoxicilina e cafeína em esgoto doméstico
7 e águas superficiais. In: Congresso ABES / FENASAN 2017, 2017, São Paulo. Anais do
8 ABES/ FENASAN 2017.
9
- 10 WILKINSON, J. *et al.* Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water:
11 Na overarching review of the field. *Environmental Pollution*, Barking, v. 231, p. 954-970, 2017.
12
- 13 WILKINSON, J. *et al.* Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *PNAS*, Washington, V.
14 119, n. 8, p. 2113947119, 2022.
15
- 16 ZHOU, H. *et al.* Occurrence and preliminarily environmental risk assessment of selected
17 pharmaceuticals in the urban rivers, China. *Scientific Reports*, London, v. 6, n. 34928, p. 1-10,
18 2016.

2.1 NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS NA REVISTA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

Disponível no link: <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/clarivate-scholarone-prod-us-west-2-s1m-public/wwwRoot/prod4/societyimages/esa-scielo/Regulamento%20ESA%20ScholarOne%202021.2.pdf>

Órgão oficial de informação técnica da ABES - Rio de Janeiro – Brasil
Outubro, 2021

Regulamento para apresentação de contribuições

1. Objetivo e Escopo

O presente regulamento objetiva uniformizar a apresentação das contribuições a serem encaminhadas para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental (RESA).

São áreas de interesse atual da RESA:

- ✓ Desenvolvimento de tecnologias ambientais (água, esgoto, resíduos sólidos e ar)
- ✓ Gerenciamento de resíduos sólidos e líquidos e recuperação de recursos
- ✓ Remediação e monitoramento ambiental (água, solo e ar)
- ✓ Sistemas de modelagem e otimização ambientais (água, esgoto, resíduos sólidos, ar e solo)
- ✓ Uso racional da água, nutrientes, energia etc.
- ✓ Saneamento rural
- ✓ Saúde pública e microbiologia ambiental
- ✓ Análise e avaliação ambiental (avaliação de impacto ambiental, análise de risco, análise de ciclo de vida, análise de fluxo de materiais etc.)
- ✓ Aspectos sociais, econômicos e políticos do gerenciamento ambiental

A RESA não aceita manuscritos exclusivamente focados nos seguintes aspectos:

- ✓ Simulação/modelagem quando predominantemente orientados para assuntos matemáticos
- ✓ Reações/processos quando predominantemente orientados para assuntos químicos sem um ponto de vista ambiental
- ✓ Síntese de materiais sem uma clara aplicação ambiental
- ✓ Reaproveitamento de resíduos com clara ênfase na área de ciência do solo

2. Formas de contribuição

2.1. As formas de contribuição são mostradas a seguir, podendo ser escritas nos idiomas português e inglês:

- Nota Técnica
- Nota Científica (*short communication*)
- Artigo Científico
- Revisão da Literatura

2.2. A Nota Técnica é uma publicação técnica crítica em temas relevantes e atuais na área da Engenharia Sanitária e Ambiental, sendo normalmente publicada na forma de Cadernos Técnicos, com chamadas definidas pelos editores. Exemplos podem ser obtidos no link: http://abes-dn.org.br/?page_id=43257

2.3. A Nota Científica (*short communication*) é uma comunicação breve de caráter urgente ou publicação de dados preliminares que necessitem uma rápida divulgação na Engenharia Sanitária e Ambiental. Pode ainda contemplar alguma outra abordagem sumária pertinente, a juízo dos Editores.

2.4. O Artigo Científico é uma exposição completa e original, totalmente documentada, interpretada e discutida, e que tenha aderência ao escopo atual da RESA. Manuscritos que sejam primordialmente dados primários, relatórios técnicos, resultados preliminares etc., sem hipóteses bem definidas ou profundidade adequada, serão rejeitados imediatamente pelos Editores de seção temática.

2.5. A Revisão da Literatura corresponde a um artigo, no qual é levantado o estado da arte de algum tema relevante e inovador e que tenha aderência ao escopo atual da RESA. A abordagem deve ser suficientemente crítica e capaz de identificar os avanços, lacunas e desafios científicos à luz da literatura nacional e internacional. Trabalhos de revisão sistemática e meta-análise podem ser incluídos nessa categoria de artigo.

2.6. Não serão aceitos relatórios, traduções e nem artigos já publicados ou submetidos à publicação em outros veículos, ou que impliquem em promoção comercial de determinada marca, produto ou empresa.

3. Encaminhamento das contribuições

3.1. A inscrição das contribuições será feita tão e somente pelo sistema Scielo Scholar One, através do link <https://mc04.manuscriptcentral.com/esa-scielo>. Não serão aceitas inscrições de artigos por nenhuma outra forma de envio.

3.2. Após a submissão do artigo, o autor receberá um e-mail de confirmação, junto com um código de identificação.

3.3. O autor poderá acompanhar todo processo de avaliação pelo sistema Scielo Scholar One.

3.4. Toda e qualquer dúvida adicional pode ser realizada pelo e-mail: esa@abes-dn.org.br, sendo sempre necessária a inclusão do número de referência do artigo submetido.

3.5. A RESA cobra uma taxa de submissão no valor de R\$ 150,00 (cento e cinquenta reais), a qual deve ser incluída no ato da submissão como anexo (arquivo complementar que NÃO é para avaliação). O processo de avaliação só será iniciado após a equipe editorial verificar a comprovação do pagamento da taxa de submissão.

A taxa destina-se a não sócios da ABES. Caso o autor principal seja sócio, anexar (arquivo complementar que NÃO é para avaliação) o documento constando o número de matrícula da ABES ou CPF e nome completo.

Obs.: A taxa de submissão não será restituída caso o manuscrito seja recusado, não garantindo o aceite do artigo, que passará normalmente pelo processo de avaliação.

Banco: Itaú

Agência: 0407

C/C 11437-0

Razão Social: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES

CNPJ: 33.945.015/0001-81

CHAVE PIX: abes@abes-dn.org.br

Obs.: Identificar transferência PIX como “artigo”.

Qualquer dúvida, favor enviar e-mail para esa@abes-dn.org.br.

Associe-se à ABES: <http://socio.abes-dn.org.br/>

4. Formato das contribuições

4.1. As contribuições devem ser preparadas pelos autores no formato “.doc” ou “.docx” aberto para edição usando o recurso de numeração de linhas do Microsoft Word (Arquivo – Configurar página – Layout – Números de linha – Numerar linhas – Contínua).

4.2. Os manuscritos devem ser enviados no formato “.doc” ou “.docx” pelo sistema Scielo Scholar One. Todos os demais formatos de arquivos, inclusive os compactados, serão bloqueados.

4.3. Após o processo avaliativo, as contribuições aprovadas para publicação poderão sofrer correções após encaminhamento em sua versão final para diagramação.

4.4. Os trabalhos submetidos devem estar de acordo com a NBR 14724:2020 – Trabalhos Acadêmicos

4.5. Poderão ser incluídos figuras, gráficos e ilustrações, desde que o tamanho do arquivo não ultrapasse 10MB.

4.6. O texto integral do artigo não poderá exceder 15 (quinze) páginas para Nota Técnica, Artigo Científico e Revisão da Literatura, e 8 (oito) páginas para Nota Científica (*short communication*), atendendo ao formato estabelecido nos itens a seguir. (Obs.: A paginação total conta com as referências).

4.7. Todas as contribuições deverão seguir a seguinte sequência de apresentação:

- Título em português e inglês (até 200 caracteres) – deve ser incluído no corpo do texto e não como cabeçalho.
- Resumo em português e inglês, de 100 a 250 palavras – deve ser incluído no corpo do texto.

- Palavras-chave em português e em inglês – deve ser incluído no corpo do texto.
- Título resumido do artigo em português ou inglês (até 60 caracteres) para o cabeçalho.
- Texto principal sem divisão em colunas.
- Referências (deve estar incluída no tamanho limite de cada tipo de contribuição)
- Obs. 1: Eventuais “Agradecimentos” deverão ser incluídos somente na versão final do artigo aprovado para publicação.
- Obs. 2: O Nome do(s) autor(es), Currículo resumido(s) do(s) autor(es), endereço para correspondência (profissional) devem constar somente no Sistema Scielo Scholar One, preenchidos no momento de cadastro. **IMPORTANTE:** a colocação destas informações no corpo do texto acarretará na devolução do manuscrito aos autores, impactando, desta forma, no tempo de avaliação/publicação.
- Obs. 3.: Contribuições que não obedeçam aos elementos definidos no presente regulamento como formato, número máximo de páginas etc., serão devolvidas aos autores, impactando, desta forma, no tempo de avaliação/publicação.

4.8. O texto deverá ser formatado obedecendo o seguinte padrão:

- Tamanho da página: A-4
- Margens: 3 cm para esquerda e superior, e 2 cm inferior e direita
- Espaçamento: 1,5, sem espaços anteriores ou posteriores entre linhas
- Fonte e tamanho do Título: Times New Roman, tamanho 16
- Fonte e tamanho dos demais elementos do texto: Times New Roman, tamanho 12
- Numeração de página: algarismos arábicos, posicionados no canto superior direito

4.9. O corpo das publicações na forma de Artigo Científico e Nota Científica (*short communication*) devem conter a seguinte estrutura:

- Introdução: deve descrever claramente o que se conhece, quais as lacunas e ao final ser colocado o objetivo da contribuição.
- Metodologia: deve ser escrita de maneira detalhada para permitir uma ampla compreensão do que foi investigado, assim como sua reprodução. A sua divisão em itens muitas vezes ajuda bastante na organização dos materiais e métodos empregados.
- Resultados e Discussão: deve apresentar de maneira clara e direta os principais resultados obtidos, com a inclusão de discussões que ajudem a explicar os dados com base na literatura técnica científica.
- Conclusões: deve responder de maneira clara e sucinta ao objetivo da contribuição, evitando-se repetições de dados já apresentados e discutidos anteriormente.
- Referências: devem ser priorizadas referências atuais (idealmente publicados nos últimos cinco anos) e que sejam facilmente obtidas por outros. Deve-se evitar e inclusão de publicações em congressos, livros etc., e valorizar a inclusão de artigos publicados em periódicos indexados.

4.10. A redação deve ser feita no modo impessoal, não se empregando a primeira pessoa singular ou plural, e o estilo a ser adotado deve ser objetivo e sóbrio, compatível como

recomendável para um texto científico.

4.11. Deverá ser evitada a subdivisão do texto em um grande número de subtítulos ou itens, admitindo-se um máximo de cabeçalhos de terceira ordem, todos com o uso de algarismos arábicos.

4.12. O conteúdo do trabalho deve ser submetido a uma criteriosa revisão ortográfica.

4.13. Termos grafados em itálico ou negrito poderão ser utilizados no corpo do artigo.

5. Figuras e ilustrações

As figuras e ilustrações devem observar os seguintes critérios:

5.1. Os arquivos das figuras e ilustrações, sem bordas ao redor, devem ser inseridos no arquivo do texto, de maneira que possam ser editados por meio do MS Word for Windows.

5.2. Os textos e legendas não devem ficar muito pequenos ou muito grandes em relação à figura.

5.3. As figuras devem ser intercaladas nos locais apropriados e apresentar um título.

5.4. A inclusão de fotografias não é aconselhável; porém, se os autores julgarem que são importantes para esclarecer aspectos relevantes do artigo, deverão ser inseridas em resolução mínima de 300 dpi. Sempre ficar atento à qualidade das imagens.

5.5. Todos os gráficos, desenhos, figuras e fotografias devem ser denominados “Figura”, e numerados sequencialmente em algarismos arábicos. Toda figura deve ser mencionada no texto.

5.6 O número e título da figura devem ser colocados centralizados, imediatamente abaixo da figura. O título deve ser claro e autoexplicativo.

5.7 Abaixo do título da figura, indicar a fonte consultada (elemento obrigatório, mesmo que seja produção do próprio autor), legendas, notas e outras informações necessárias à sua compreensão (se houver).

5.8. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos gráficos e diagramas.

6. Quadros e tabelas

Os quadros e tabelas deverão atender os seguintes critérios:

6.1. Os quadros e tabelas devem ser claros e objetivos, sem linhas de grade. As unidades

correspondentes a todos os termos usados devem ser claramente identificadas.

6.2. Todos os quadros ou tabelas devem ser denominados “Quadro” ou “Tabela”, numerados sequencialmente em algarismos arábicos e mencionados no texto.

6.3. Cada quadro e tabela, além da numeração, deve possuir um título. O número e o título devem ser colocados centralizados, imediatamente acima do quadro ou tabela. O título deve ser claro e autoexplicativo.

6.4. Um quadro e uma tabela não poderão ser maiores do que uma folha A-4.

6.5. Quadros e tabelas devem aparecer, preferencialmente, intercalados nos locais apropriados do texto, a critério do autor.

6.6. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos quadros e tabelas.

7. Equações

As equações podem ser editadas pela equipe responsável pela diagramação. Portanto, os seguintes critérios devem ser satisfeitos:

7.1. As equações devem ser claras e legíveis, e escritas com a mesma fonte do corpo do texto, sem a utilização de itálico ou negrito.

7.2. As equações e fórmulas devem ser denominadas “Equação” e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. A numeração à direita da equação deve ser entre parênteses. Todas as equações devem ser mencionadas no texto.

7.3. Todos os símbolos usados devem ser definidos imediatamente após a equação (caso não tenham sido definidos anteriormente), incluindo as suas unidades ou dimensões.

8. Unidades

8.1. Todas as unidades mencionadas no texto, tabelas, quadros e figuras devem ser expressas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI).

8.2. Deve-se evitar o uso da barra de fração na expressão das unidades. Exemplo: Ao invés de mg/L ou m³/s, deve-se utilizar mg·L⁻¹ e m³·s⁻¹.

9. Referências

As referências citadas no texto e listadas ao final do artigo deverão estar de acordo com a norma NBR 6023:2018. A título de esclarecimento são apresentadas algumas diretrizes:

9.1. As referências citadas no texto devem conter o sobrenome do(s) autor(es), em caixa alta, seguidos pelo ano da publicação, observando-se os seguintes critérios:

9.1.1. Quando houver mais de um trabalho, as citações devem ser em ordem alfabética.

9.1.2. Trabalhos com mais de três autores devem ser referenciados ao primeiro autor, seguido por “*et al.*” (em itálico e com ponto).

9.1.3. Quando houver mais de uma publicação do mesmo autor, no mesmo ano, o ano da publicação deve ser seguido dos componentes “a, b, c...”, em ordem alfabética. Exemplos: ... estudos efetuados por Silva (1994a, 1994b) e por Machado *et al.* (1995a) revelaram...; ... estudos recentes (SOUZA, 1993; SILVA, WILSON e OLIVEIRA, 1994; MACHADO *et al.*, 1995b) revelaram...

9.2. Ao final do trabalho deverá ser apresentada uma lista de todas as referências citadas no texto, de acordo com os seguintes critérios, entre outros:

9.2.1. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

9.2.2. Devem ser referenciados todos os autores (independentemente do número de autores) pelo sobrenome seguido pelas iniciais de cada autor, separados por ponto e vírgula. Exemplo: SMITH, P.J.; WATSON, L.R.M.; GREEN, C.M...

9.2.3. O título do periódico referenciado deverá ser apresentado em itálico. As indicações de volume, número e página deverão ser identificados pela letra inicial (“v”, “n” ou “p”), seguida de ponto. Não devem ser utilizadas aspas antes e depois do título do trabalho.

Exemplo: JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film systems. *Water Environment Research*, v. 64, n. 6, 1992, p. 756-65.

9.2.4. O título do livro deve ser apresentado em itálico. Devem ser incluídos a edição, o local, a editora, o número de páginas e a data.

Exemplo: FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS A.C. *Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas*. 8 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007, 255 p.

9.2.5. Em capítulos de livros e trabalhos de congressos, a obra principal (título do livro ou denominação do congresso) é referenciada em itálico e vem precedida da expressão “In”.

Exemplos:

Anais - CAIXINHAS, R.D. Avaliação do impacto ambiental de empreendimentos hidro-agrícolas. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Anais... Lisboa: APRH, 1992, p. 203-11.

Capítulo de Livro - KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; IVES, K. Diversity of toluene degradation following exposure to BTEX in situ. In: KAMELY, D.; CHAKABARTY, A.; OLSEN, R.H. (Eds.) *Biotechnology and Biodegradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, E.U.A., 1989, p. 405-421.

10. Julgamento

10.1. Os Editores de seção temática poderão em análise prévia, recusar sumariamente qualquer artigo encaminhado se julgarem que não apresenta contribuição/ineditismo ou escopo compatíveis com a classificação da revista.

10.2. Quando o manuscrito possui ineditismo e qualidade suficiente, este é encaminhado aos avaliadores designados pelo Editor de seção temática, estes sendo consultores ad hoc qualificados para esta função.

10.3. Em qualquer etapa de julgamento do trabalho, serão levados em consideração a obediência às disposições regulamentares, o relacionamento do tema à Engenharia Sanitária e Ambiental, adequação do título, do resumo e das palavras-chave, existência de encadeamento lógico, ineditismo e qualidade da contribuição.

10.4. Na análise dos editores e dos avaliadores, a contribuição será classificada segundo uma das seguintes categorias:

- Aceito
- Revisões requeridas
- Rejeitado

A rejeição poderá se dar das seguintes formas.

1 - Rejeição direta pelo corpo editorial.

- ✓ Não adequação ao escopo.
- ✓ Por julgamento de qualidade do editor.
- ✓ Verificação por meio de programa anti-plágio.

2 - Rejeição com possibilidade de resubmissão. Contudo, a resubmissão ficará condicionada aos mesmos processos de avaliação, não havendo nenhuma garantia quanto ao aceite do manuscrito.

3 - Rejeição com indicação para publicação na Revista Brasileira de Ciências Ambientais (RBCIAMB). Esta indicação não se dará quando a rejeição estiver alinhada ao item 1.3. Neste caso, os autores terão isenção automática ao submeter artigo nesta revista, porém, será necessário encaminhar um documento informando que se trate de um encaminhamento da revista ESA, com ID e nome completo do autor e anexar na plataforma indicada por esta revista. O processo de avaliação ficará a critério dos Editor Chefe da revista.

Contato: rbciamb@abes-dn.org.br

10.5. Quando o artigo recebe a classificação de “Revisões requeridas”, os autores devem realizar as correções com base nas sugestões dos avaliadores e eventualmente do Editor de seção temática. No momento da resubmissão do manuscrito no sistema Scielo Scholar One (<https://mc04.manuscriptcentral.com/esa-scielo>), o mesmo deve mostrar claramente no documento com formato “.doc” ou “.docx” as inclusões/exclusões realizadas, por meio de ferramentas de controle de alterações, não sendo permitido a inclusão de caixas de texto, comentários etc. Os autores deverão preparar um arquivo separado contendo as respostas aos questionamentos dos revisores e/ou Editor de sessão temática, os quais poderão ser enviados como anexo ou na área específica de resposta aos revisores no sistema Scielo Scholar One durante o processo de resubmissão.

11. Comunicação aos autores

O autor principal será comunicado do resultado da avaliação e no caso de artigos recusados, receberão as devidas justificativas.

12. Número de autores

O número de autores permitido para cada submissão é de até cinco. Casos excepcionais enviar e-mail para esa@abes-dn.org.br para consulta.

13. Responsabilidades e direitos

O conteúdo dos artigos é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es), que declaram se responsabilizar por qualquer reclamação de terceiros quanto a conflitos envolvendo direitos autorais, assumindo e isentando a ESA/ABES e seus editores de qualquer pendência envolvendo suas publicações. Os autores que encaminharem seus artigos cedem à ESA/ABES os respectivos direitos de reprodução e/ou publicação. Os casos omissos serão resolvidos pelos editores

3 “PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DE BACTÉRIAS NA MICROBACIA DO RIO BRANCO, RORAIMA, EXTREMO NORTE DA AMAZÔNIA”

Disponível no link: <http://www.sustenere.co/index.php/rica/article/view/6373/3360>

Perfil de susceptibilidade das bactérias na microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo Norte da Amazônia

A qualidade dos recursos hídricos se constituiu em uma categoria primordial de preocupação para os pesquisadores, pois os impactos ambientais ocasionados pelo crescimento acelerado e desordenado das cidades torna a degradação desses recursos intensa e rapidamente perceptível, inclusive no extremo norte da Amazônia. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de susceptibilidades das bactérias isoladas da microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo norte da Amazônia. Realizou-se o perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos empregando-se oito discos de antibacterianos e na identificação dos isolados empregou-se o método de Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/MS). Os resultados obtidos demonstraram diferença significativa entre os períodos seco e chuvoso em relação à qualidade físico-química e microbiológica da água nos diferentes pontos coletados na microbacia do Rio Branco, RR. Do total de isolados analisados, apenas 31 % das bactérias, apresentaram resistência aos antibacterianos amicacina, amoxicilina, azitromicina e ciprofloxacina, evidenciando que os antibacterianos clorafenicol, gentamicina, imipenem e meropenem apresentaram eficiência de 100% sobre os isolados. Foram identificadas as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter kobei*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhi* e do gênero *Staphylococcus* sp. em ambos os períodos (seco e chuvoso) de coletas avaliados, sendo constatado a presença de bactérias consideradas potencialmente patogênicas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella* sp., tornando necessário a continuidade de estudos que visem identificar e avaliar o perfil de susceptibilidade das bactérias presentes em outros rios e igarapés do estado de Roraima.

Palavras-chave: Resistência; Antibacteriano; Recursos hídricos; Bactérias patogênicas.

Bacteria susceptibility profile in the Rio Branco microbasin, Roraima, Northern North Amazon

The quality of water resources is a primary concern for researchers, as the environmental impacts caused by the accelerated and disorderly growth of cities make the degradation of these resources intense and quickly noticeable, even in the extreme north of the Amazon. In this context, the aim of this study was to evaluate the susceptibility profile of bacteria isolated from the Rio Branco microbasin, Roraima, in the far north of the Amazon. The susceptibility profile of the bacterial isolates was carried out using eight antibacterial discs and in the identification of the isolates the Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization method – Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/MS) was used. The results obtained showed a significant difference between the dry and rainy periods in relation to the physical-chemical and microbiological quality of the water in the different points collected in the Rio Branco microbasin, RR. Of the total analyzed isolates, only 31% of the bacteria showed resistance to the antibacterials amicacin, amoxicillin, azithromycin and ciprofloxacin, showing that the antibacterials chloraphenicol, gentamicin, imipenem and meropenem showed 100% efficiency on the isolates. The species *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter kobei*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus* sp. in both periods (dry and rainy) of collections evaluated, the presence of bacteria considered potentially pathogenic, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* and *Shigella* sp. that aim to identify and evaluate the susceptibility profile of bacteria present in other rivers and streams in the state of Roraima.

Keywords: Resistance; Anti-bacterial; Water resources; Pathogenic bacteria.

Topic: **Desenvolvimento, Sustentabilidade e Meio Ambiente**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Received: **06/10/2021**

Approved: **28/10/2021**

Leovergildo Rodrigues Farias 

Universidade Federal de Roraima, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5817194670197874>
<http://orcid.org/0000-0002-7852-3771>
leovergildofarias@yahoo.com.br

Marcos Jose Salgado Vital

Universidade Federal de Roraima, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7855596789769104>
marcos.vital@ufr.br

Ana Paula Folmer Correa 

Universidade Federal de Roraima, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6615922848800872>
<http://orcid.org/0000-0001-7588-5657>
folmercorrea@gmail.com

Jordana Souza Paula Riss 

Universidade Federal de Roraima, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3739082711909793>
<http://orcid.org/0000-0003-4815-4140>
jordana.riss@ifrr.edu.br

Fabiana Vieira Tormente 

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8046065103149498>
<http://orcid.org/0000-0003-4882-5725>
fabianatormente@gmail.com



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2021.010.0034

Referencing this:

FARIAS, L. R.; VITAL, M. J. S.; CORREA, A. P. F.; RISS, J. S. P.; TORMENTE, F. V.. Perfil de susceptibilidade das bactérias na microbacia do Rio Branco, Roraima, extremo Norte da Amazônia. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.12, n.10, p.428-442, 2021. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.010.0034>

INTRODUÇÃO

As poluições dos rios estão intimamente relacionadas à falta de saneamento básico, ao crescimento desordenado das cidades e a densidade populacional (CARVALHO et al., 2016). As águas dos rios são os principais receptores de antibacterianos e bactérias resistentes, visto que recebem os esgotos urbano, industrial e hospitalar. Esses poluentes são descartados em excesso no ambiente e podem contribuir para a manutenção e até disseminação da resistência bacteriana (CARVALHO et al., 2016; SILVA, 2014).

A resistência bacteriana é definida como o processo de desenvolvimento de resistência em microrganismos-bactérias, vírus, parasitas e fungos - a antibiótico ao qual possuíam anteriormente sensibilidade. Essa resistência é uma ameaça crescente à saúde pública mundial em razão da proliferação acelerada de bactérias multirresistentes aos antibacterianos existentes, acarretando graves infecções. São cerca de 700.000 mortes por ano, ocasionadas por infecções causadas por bactérias resistentes a antibacterianos.

O crescente aumento da resistência bacteriana tem sido difundido diariamente na literatura científica e nos meios de comunicações populares. Os antibacterianos constituem a classe de compostos farmacêuticos frequentemente usados e bem-sucedidos para a medicina humana (WOODFORD et al., 2014). Todavia, a velocidade de dispersão da resistência bacteriana a esses antibacterianos tem ocasionado preocupações médicas à população. Tais bactérias resistentes podem ser oriundas de contaminação antrópica ou decorrentes de seleção por meio da contaminação ambiental por antibacterianos.

A qualidade das águas naturais está diretamente relacionada à presença de microrganismo, principalmente de bactérias. Por esse motivo, o conhecimento da microbiota e o monitoramento de bioindicadores se tornam primordiais para sanar problemas ambientais e de saúde pública relacionada à qualidade da água. Águas contaminadas, com tratamento ineficiente ou ainda, sem nenhum tratamento, geram efeitos desfavoráveis à população, como a poluição, a perda da biodiversidade e a proliferação de doenças de veiculação hídrica.

No Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, as chuvas são irregulares, tornando os reservatórios de águas uma alternativa de abastecimento durante o período de estiagem. Tal forma de armazenagem gera preocupações quanto à qualidade, contaminação e manutenção dessas fontes (NASCIMENTO et al., 2016). Nesse contexto, a avaliação da presença e identificação de bactérias resistentes a antibacterianos são fundamentais para avaliar a qualidade das águas, proporcionando informações às comunidades locais sobre os riscos à saúde.

Formado pela confluência dos Rios Tacutu e Uraricoera, o Rio Branco está localizado no Estado de Roraima, extremo norte da região Amazônica Ocidental, com a capital Boa Vista estrategicamente estabelecida às suas margens. Boa Vista é o município mais populoso do Estado. Dos aproximados 613 mil habitantes, 419 652 mil estão na capital conforme estimativa do IBGE, em 2020. O Rio Branco é o responsável por abastecer uma parte da cidade e atualmente é o corpo receptor do efluente da estação de tratamento de esgoto (SATELLES et al., 2018).

Entre os corpos hídricos que compõem a bacia do Rio Branco, no perímetro urbano de Boa Vista, destacam-se o Igarapé Grande, receptor do efluente gerado no tratamento do esgoto pelo sistema de lagoas de estabilização, e o Igarapé Mirandinha, que perpassa por alguns bairros da capital e deságua no Rio Branco, à montante do ponto de captação da água feito pela Companhia de Água e Esgoto de Roraima-CAER. Após o tratamento a água é distribuída para o consumo humano. Em grande parte de seu curso, o Mirandinha encontra-se canalizado, e isso vem acarretando alguns problemas como o acúmulo de lixo, lançamento de esgoto e o assoreamento.

Assim, considerando a importância do Rio Branco e dos igarapés para a população do Estado de Roraima, especialmente para a capital Boa Vista, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidades a antibacterianos das bactérias presentes no Rio Branco, no Igarapé Mirandinha e no Igarapé Grande, na área adjacente a capital Boa Vista.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local e Procedimento de Amostragem

O estudo foi desenvolvido no Rio Branco, na foz do Igarapé Grande e Igarapé Mirandinha, sendo os pontos de coletas caracterizados das seguintes formas: Ponto 0, situado a 800 metros a jusante do deságue do efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE), no Rio Branco; Ponto 1, localizado no deságue do efluente da ETE no Rio Branco; Ponto 2, situado na foz do Igarapé Grande; Ponto 3, sito a cerca de 500 metros à montante do deságue do efluente da ETE; Ponto 4, situado a aproximadamente 2 metros acima do ponto de captação da água que após tratamento pela CAER é destinada ao abastecimento de uma parte da população de Boa Vista; Ponto 5, situado na Foz do Igarapé Mirandinha e Ponto 6, situado a aproximadamente 800 metros à montante da foz do Igarapé Mirandinha com o Rio Branco. Os pontos de coletas, Figura 1, foram escolhidos de tal modo que este estudo avalie a presença de possíveis bactérias resistentes a antibacterianos tradicionalmente utilizados pela população, permitindo avaliar a qualidade da água e prever quais bactérias estão presentes com maior frequência e quais são potencialmente patogênicas.

As amostras foram coletadas em águas superficiais, a uma profundidade de aproximadamente 30 cm abaixo da superfície, utilizando-se frascos estéreis de 500 mL. Após a coleta, os frascos foram armazenados e transportados sob refrigeração, até o momento das análises (NBR 9897), no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima. Foram realizadas duas coletas, uma, no mês de setembro (período de chuvas) e outra no mês de dezembro (período de estiagem). Com auxílio de uma sonda multiparâmetros, modelo HI 9829 HANNA e de um turbidímetro portátil, modelo HI 93703 HANNA, foram medidos dados físico-químicos (pH, temperatura, turbidez e oxigênio dissolvido) da água nos pontos de coletas. Tais amostras foram coletadas duas vezes, em função de limitações de recursos laboratoriais e tempo envolvido nas análises.

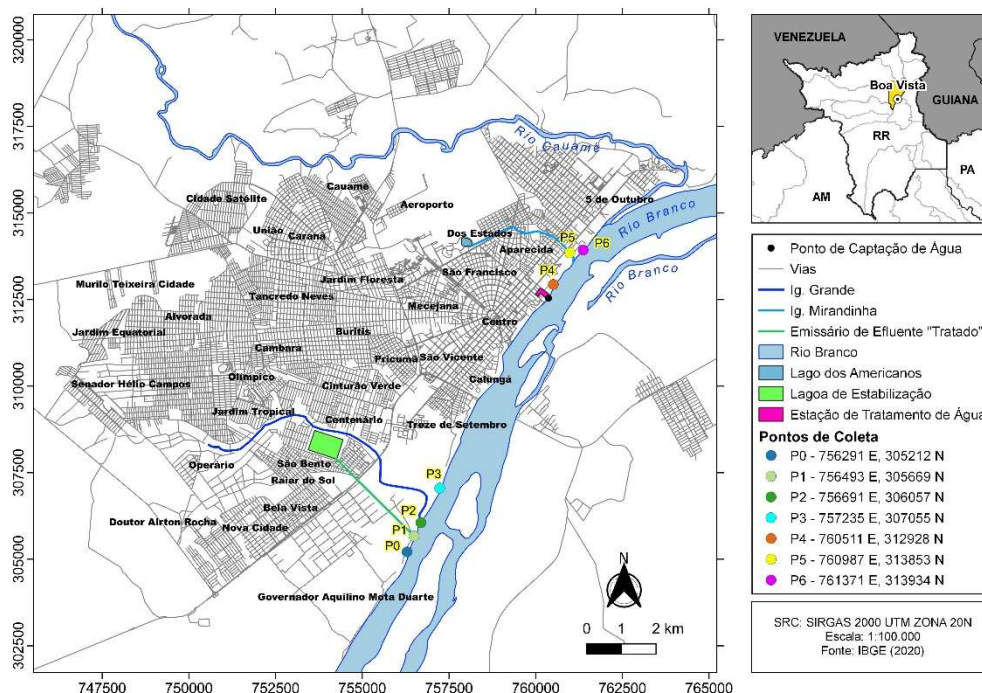


Figura 1: Localização dos pontos de coletas na microbacia do Rio Branco, RR.

Os resultados foram analisados utilizando a estatística descritiva, com o objetivo de sintetizar valores, permitindo alcançar uma visão global da variação desses valores. Esta estatística organiza e descreve os dados por tabelas, gráficos e de medidas descritivas.

Isolamento, contagem, agrupamento e codificação bacteriana

As amostras de água bruta foram diluídas em solução salina 0,85 % até 10^{-4} μL e inoculadas em superfície em placa contendo o meio de cultura Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas a 35°C , sendo realizada a contagem de colônias após 24 e 48 horas de incubação.

As colônias das bactérias heterotróficas foram contadas e consideradas apenas as diluições que apresentavam entre 30 e 300 colônias por placa, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)). Após a contagem, as bactérias foram inicialmente agrupadas conforme as características macromorfológicas: cor, borda, brilho, cremosidade e elevação. Por conseguinte, as colônias foram codificadas segundo o local de coleta. Após a codificação, uma colônia de cada código foi selecionada e obtida a cultura pura.

Para a obtenção de cultura pura das bactérias heterotróficas utilizou-se a técnica do esgotamento em superfície utilizando o meio BHI e incubadas a 35°C por 24 horas. Os dados referentes à densidade de bactérias heterotróficas foram processados utilizando-se a estatística descritiva, determinando a média, a variância e o desvio padrão.

Testes de Sensibilidade aos Antibacterianos

A susceptibilidade a antibacterianos dos isolados foi realizada pelo método de difusão em Ágar Mueller Hinton, descrita por Kirby-Bauer em 1966. A densidade do inóculo foi ajustada para a escala 0,5 de

McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, e incubado a 35 °C por 24 horas. Os discos de antibacterianos utilizados foram: Amoxicilina (AMO 10 µG), Amicacina (AMI 30 µG), Gentamicina (GEN 10 µG), Azitromicina (AZI 15), Cloranfenicol (CLO 30 µG), Ciprofloxacina (CIP 5 µG), Imipenem (IPM 10 µG) e Meropenem (MER 10 µG), considerando os mecanismos de resistência que incluem a produção de enzimas que inativam a droga, a alteração dos alvos de ação da droga e alteração da permeabilidade da membrana externa ou efluxo da droga. A interpretação das zonas de inibição foi realizada de acordo com a tabela de valores de resistência e antibiogramas da CLSI.

O índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) foi calculado por meio da divisão do número de antibacterianos ao qual a bactéria foi resistente (a) pelo número de antibacterianos testados (8), multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentuais (HIRSCH et al., 2006).

Identificação das bactérias

As análises foram realizadas por meio do método de Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF/MS). Esta técnica foi realizada através do método de extração química, de acordo com o protocolo etanol/ácido fórmico, onde os isolados foram cultivados em meio BHI a 37 °C por 24 horas e, aproximadamente 5 a 10 mg de material foi utilizado para a análise.

A identificação das bactérias foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), utilizando o equipamento Maldi Bioyper 4.0, equipado com o *software* MBT OC, pela técnica da espectrometria de massas.

Neste estudo, calculou-se a frequência de ocorrência (F), que demonstra a relação entre a ocorrência das diferentes espécies e o número total de amostras analisadas. Essa frequência é dada pela relação ($F = (Pa \times 100)/P$), em que Pa é o número de amostras em que determinada espécie está presente e P é o número total de amostras analisadas (LOBO et al., 1986). Os resultados foram expressos em porcentagem e, as espécies foram consideradas raras, quando a frequência for menor que 10%, comuns, quando $10\% < F < 50\%$ e constante, quando a frequência for maior que 50 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros físico-químicos

Os corpos hídricos da bacia do Rio Branco não possuem suas águas enquadradas nas classes dispostas na Resolução do CONAMA n.357/2005 (BRASIL, 2005). Assim, conforme a Resolução mencionada, especificamente no art. 42, enquanto não forem aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, aplicando assim, essa classificação como referência para os corpos hídricos em estudo. Os resultados obtidos nas análises dos parâmetros físico-químicos nas águas do Rio Branco e na foz do Igarapé Grande e do Igarapé Mirandinha estão dispostos no gráfico 1.

Conforme o gráfico 1, os resultados obtidos nas análises do parâmetro oxigênio dissolvido (OD), com exceção do ponto 1, estão em conformidade com a resolução do CONAMA 357/2005 (maior que 5 mg/L). A

baixa concentração de OD para o ponto 1 pode ser atribuída à presença de matéria orgânica, visto que esse ponto é a zona de mistura do efluente do sistema de lagoa de estabilização. Não obstante, verificam-se temperaturas elevadas, nas duas coletas, nesse ponto de amostragem, o que favorece a disponibilidade de oxigênio. Os resultados para este parâmetro, corroboram com o estudo feito por Satelles et al. (2018), no Igarapé Grande, zona urbana de Boa Vista, Roraima

Não existe um limite estabelecido para a temperatura na Resolução do CONAMA n.357/2005. Contudo, a temperatura da água é essencial para o desenvolvimento das espécies aquáticas, além desse fato, a temperatura dos corpos hídricos também influencia diretamente na solubilidade do oxigênio dissolvido, inclusive no desenvolvimento metabólico dos microrganismos. Conforme o gráfico 1, o ponto 1 no período chuvoso e o ponto 3 no período de seca, apresentaram os maiores valores para a temperatura (31 °C). A temperatura mais baixa foi registrada para o ponto 2, no período chuvoso. Pode-se inferir a esse resultado, a presença de vegetação ciliar, corroborando com o estudo desenvolvido por Esbel (2006) e Santana (2006).

O limite máximo estabelecido na Resolução CONAMA citada, para a classe 2, para a turbidez é de 100 Unidades Nefelométrica de Turbidez (NTU). Conforme o gráfico 1, todos os valores determinados para este parâmetro, estão em conformidade com a resolução, entretanto, observa-se que o ponto 1 (zona de mistura), apresentaram os maiores valores para este parâmetro, em ambos os períodos temporais coletados. É importante destacar, que nesse ponto de coleta, a água apresenta uma tonalidade esverdeada, característica de ambiente eutrofizado e rico em matéria orgânica. A tendência para os valores encontrados nesse estudo para este parâmetro se assemelha aos encontrados por Satelles et al. (2018).

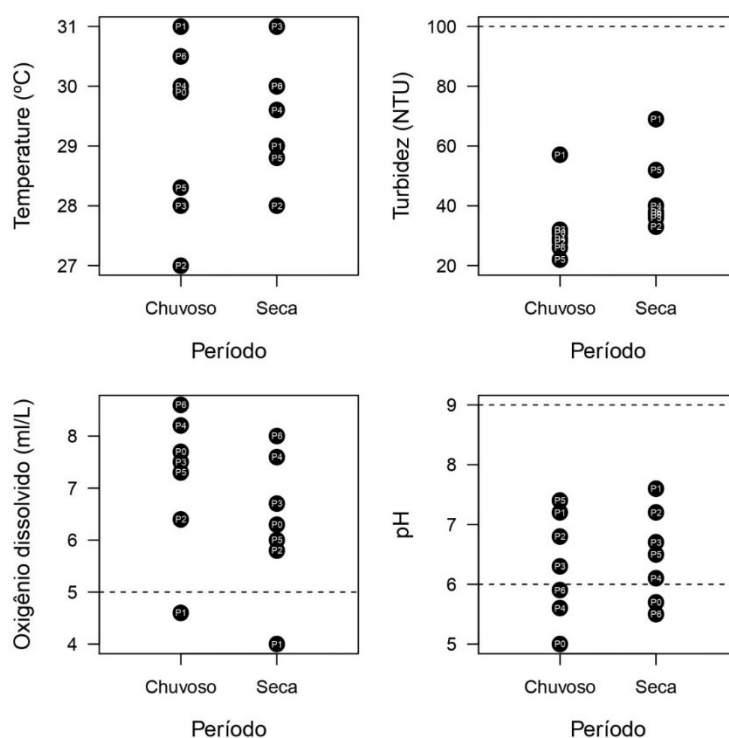


Gráfico 1: Resultados dos parâmetros físico-químicos de amostras de água da microbacia do Rio Branco, RR.

Conforme o gráfico 1, a maioria dos valores determinados para o pH, estão em conformidade com a Resolução do CONAMA citada (pH entre 6 a 9), com exceção do ponto 4 no período chuvoso e dos pontos 6

e 0, que tiveram seus valores abaixo do mínimo estabelecido, em ambos os períodos. Os recursos hídricos em estudo, apresentam suas águas com tonalidades barrentas e escuras, características dos rios da região amazônica, ocasionada pela disposição de materiais proveniente de plantas das suas margens, o que possibilita a produção de ácido húmicos e conseqüentemente um pH de águas ácidas, estando de acordo com a literatura para corpos de águas escuras da região amazônica (HORBE et al., 2008).

Observa-se de modo geral que não há uma nítida tendência de alteração dos parâmetros determinados em relação aos períodos (seco e chuvoso), possibilitando afirmar que não houve uma correlação significativa entre os períodos de coleta (chuvoso e seco) e os parâmetros físico-químicos.

Densidade de bactérias heterotróficas

A contagem de bactérias heterotróficas, fornece informações sobre a qualidade bacteriológica da água de uma forma ampla. Nesse estudo, os valores obtidos em relação a densidade de bactérias heterotróficas e suas respectivas médias estão disponíveis na tabela 1.

Conforme a tabela 1, observa-se uma variação espacial (entre os pontos coletados) e temporal (período seco e chuvoso) nas médias das densidades de bactérias heterotróficas.

As maiores médias de densidade de bactérias heterotróficas foram obtidas nos pontos 1, 5 e 4 e as menores médias nos pontos 3, 0 e 6, observando-se uma continuidade na sequência de variação das médias da densidade de bactérias heterotróficas nos pontos de coletas em ambos os períodos coletados (período seco e chuvoso). Essa continuidade na variação das médias das densidades de bactérias, nos diferentes pontos coletados era previsível, principalmente, nos pontos 1, 5 e 2, pois esses pontos recebem o efluente do sistema de tratamento de esgoto do município de Boa Vista, sendo o ponto 1, principal corpo receptor do efluente.

Tabela 1: Resultados da avaliação da densidade de bactérias heterotróficas em amostras de água da microbacia do Rio Branco, RR.

Período chuvoso					Período Seco				
Pontos de coletas	Média (UFC mL ⁻¹)	Desvio Padrão	Variância	Pontos de coletas	Média (UFC mL ⁻¹)	Desvio Padrão	Variância		
0	114,67	2,52	6,33	0	101,00	3,00	9,00		
1	296,33	4,51	20,33	1	292,67	3,51	12,33		
2	260,02	3,51	12,33	2	212,00	3,61	13,00		
3	134,00	3,61	13,00	3	119,00	4,00	16,00		
4	205,67	6,03	36,33	4	220,67	3,06	9,33		
5	294,33	4,04	16,33	5	242,00	3,00	9,00		
6	98,67	3,79	14,33	6	90,33	4,04	16,33		

A menor ocorrência na densidade de bactérias heterotróficas foi observada no ponto 6, nos dois períodos coletados. Tal ocorrência pode estar associada ao fato deste ponto encontrar-se localizado no Rio Branco, onde não há lançamento de esgotos e redes de sistema de drenagem do município de Boa Vista.

No ponto 1, que apresentou maior densidade de bactérias heterotróficas, está situado o lançamento do efluente do sistema de tratamento de esgoto do município. Durante as coletas, foi verificado que as águas nesse ponto possuíam a coloração esverdeada, sugerindo um ambiente eutrofizado. Foi constatado ainda, que embora o lançamento do efluente seja exclusivamente nesse ponto, verificou-se o lançamento do

efluente da ETE no ponto 2 e o lançamento do esgoto bruto (sem tratamento) no ponto 5. O fato observado contribui para o aumento de bactérias no Rio Branco, pois, segundo Carvalho et al. (2016), a poluição dos recursos hídricos no Brasil é decorrente, principalmente, do despejo de efluentes de esgotos.

Segundo Moura et al. (2009), o aumento das chuvas, ocasiona o carreamento de microrganismo das margens para o interior dos corpos d'água. Essa afirmação é evidente nesse estudo, pois conforme os dados da Tabela 1, as médias das densidades de bactérias heterotróficas foram maiores no período chuvoso em relação ao período de seca, corroborando com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2012), Araujo et al. (2015), e contrariando os resultados obtidos em um estudo desenvolvido por Vasconcellos et al. (2006).

No Brasil, a Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021, que dispõe sobre a consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2021), recomenda que a densidade de bactérias heterotróficas em águas destinadas a consumo humano, não exceda o limite de 500 UFC/mL da amostra. Todavia, não há regulamentação para densidade de bactérias heterotróficas em águas de recreação (BRASIL, 2000). Assim, esses resultados demonstram-se satisfatórios, uma vez que os valores encontrados estão abaixo do limite estabelecido para água potável.

O estudo em tela, realça a importância dos resultados obtidos, pois gera um motivo de grande preocupação em relação à ocorrência e distribuição de bactérias heterotróficas no Rio Branco, que possivelmente apresentam mecanismo de resistência a antibacterianos advindos de fontes diversas, principalmente do efluente do sistema de tratamento de esgoto do município. Ademais, a cerca de 50 metros a jusante do ponto 5, está situado o ponto de captação da água que após tratamento é destinada a consumo humano de uma boa parte do município de Boa Vista.

Caumo et al. (2010) asseguram que a detecção da presença de bactérias resistentes a antibacterianos é importante por poder traçar o perfil de resistência ambiental, pois pode haver transferência do gene de resistência para outras bactérias potencialmente patogênicas, fato que gera uma gravidade à saúde, tornando ineficiente o tratamento.

Perfil de susceptibilidade das bactérias isoladas

Os resultados das análises do perfil de susceptibilidade das bactérias isoladas dos pontos de coletas estudados estão disponíveis, simultaneamente, no gráfico 2.

Os resultados dos testes de susceptibilidade do total de isolados analisados, mostraram que 31% das bactérias, apresentaram resistência a pelo menos um dos oito antibacterianos utilizados.

Conforme o gráfico 2, verifica-se que os antibacterianos clorafenicol, Gentamicina, Imipenem e Meropenem apresentaram eficiência de 100% sobre os isolados, nos períodos seco e chuvoso em todos os pontos de coletas estudados. Esses resultados, divergem dos resultados encontrados por Costa et al. (2016), nos rios Cuiabá e Coxipó e de Souza et al. (2014), no rio Paraná. Entretanto, corroboram com o estudo desenvolvido por Martinhago et al. (2008). Wambugu et al. (2015), que também observaram elevada eficiência desses antibacterianos em um estudo do perfil de susceptibilidade de bactérias a antibacterianos em 318 amostras de águas do Rio Athi no condado de Machakos, Quênia.

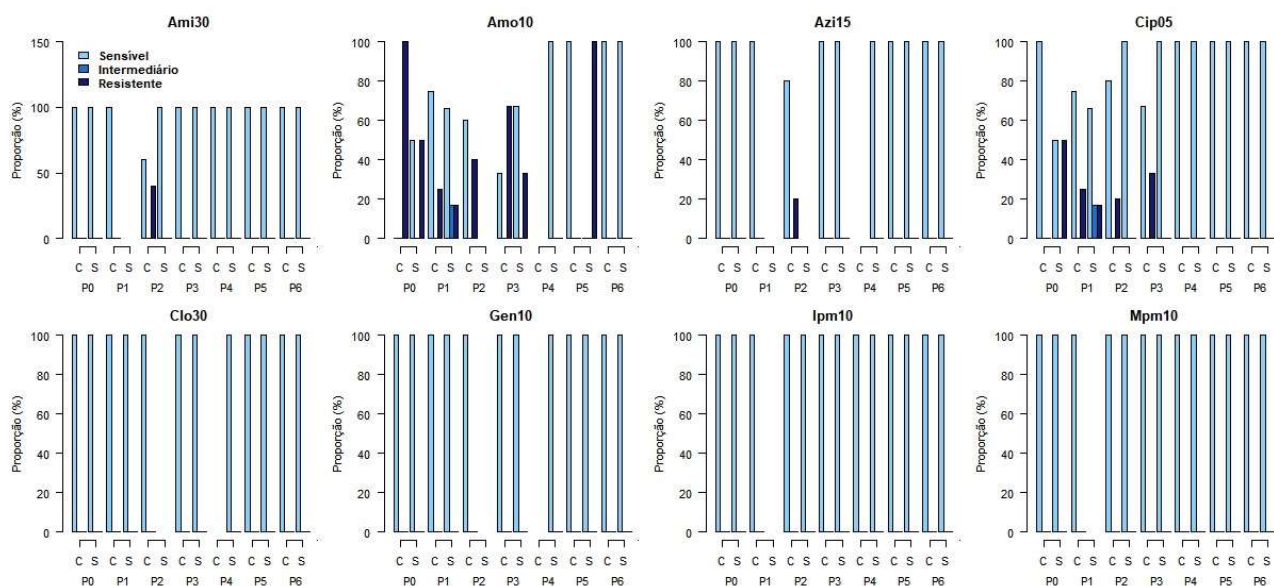


Gráfico 2: Resultados dos testes de susceptibilidade das bactérias isoladas de amostras de água do Rio Branco-RR a antibacteriano.

Ainda conforme o gráfico 2, observa-se resistência de bactérias a antibacteriano, apenas a amicacina, amoxicilina, azitromicina e ciprofloxacina. Resistência à amicacina foi observada em 40 % dos isolados, apenas no período chuvoso no ponto 2. Por outro lado, esse antibacteriano se mostrou eficiente para os demais isolados em todos os outros pontos estudados. Esses resultados divergem dos resultados encontrados no estudo desenvolvido por Fuentesfria et al. (2008), no efluente hospitalar e no rio Passo Fundo e de Martins et al. (2019), em isolados de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo.

Os resultados da porcentagem de resistência para a amoxicilina, independente do ponto de coleta analisado, demonstra que 28,6 % das bactérias isoladas, apresentaram resistência a esse antibacteriano. Essa resistência é verificada nos pontos P0, P1, P2, P3 e P5. Esses pontos são os mais impactados neste estudo, pois recebem o efluente da estação de tratamento de esgoto do município. Esses resultados para a amoxicilina, apoiam os estudos desenvolvidos por França et al. (2014), em águas de áreas de recreação da região sul de Minas Gerais e de Bortoloti et al. (2018), em fontes canalizadas na região sul de Minas Gerais.

A resistência à azitromicina foi constatada apenas nos pontos P1 e P2 em 4,28 (20 %). Isso demonstra que o antibacteriano em questão, apresentou-se eficiente para os demais testes de susceptibilidade nos outros pontos estudados. Segundo Oliveira et al. (2021), o uso de medicamentos sem prescrição médica pode ocasionar danos à saúde e aumentar o risco de resistência antimicrobiana, principalmente, a azitromicina, que tem sido utilizado de forma descontrolada nesse período de pandemia, ocasionada pela nova espécie do coronavírus, denominado SARS-CoV-2. Por esse motivo, embora os resultados para resistência a esse antibacteriano tenham sido satisfatórios para saúde pública, pode-se inferir que se faz necessário a análise de novos testes de susceptibilidade para este antibacteriano em isolados de bactérias nas águas superficiais.

As análises dos testes de susceptibilidade para o antibacteriano ciprofloxacino, revelam que 11,9 % das bactérias analisadas apresentaram-se resistentes. Jacoby (2005) afirma que a resistência ao ciprofloxacino ocasiona um problema de saúde pública, pois tem sido livremente utilizado na aquicultura e

nos processos industriais de produção animal. Resultados similares foram encontrados por Schneider et al. (2009), em um estudo do perfil de susceptibilidade a antibacterianos de 104 isolados de águas superficiais do Rio Lajeado–Suruví, Concórdia-SC. Segundo França et al. (2014), a detecção de bactérias multirresistentes tornam-se importantes para saúde pública, pois esse fenômeno dificulta o tratamento de doenças infecciosas. Nessa pesquisa, os resultados obtidos para o índice de MAR, estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2: Índice de múltipla resistência a antibacterianos (MAR) de bactérias isoladas de amostras de água do Rio Branco, RR.

Isolado bacteriano	Ponto de Coleta	Antibacteriano	Índice de MAR (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P0	AMO 10, CIP 05	25
<i>Enterobacter asburiae</i>	P1	AZI 15, CIP 05	25
<i>Escherichia coli</i>	P1	AMO 10, CIP 05	25
<i>Providencia sp.</i>	P2	AZI 15, AMO 10, AMI 30, CIP 05	50
<i>Escherichia coli</i>	P2	AMO 10, AMI 30	25
<i>Escherichia coli</i>	P3	AMO 10, CIP 05	25

Em relação ao perfil de multirresistência, para os 42 isolados, independente do período seco ou chuvoso, a tabela 2 demonstra 14,28 % dos isolados bacterianos apresentaram o índice de MAR igual ou superior a 25%, demonstrando assim, resistência associada a dois ou mais dos oito antibacterianos testados.

Esse perfil de múltipla resistência foi verificado somente para os isolados bacterianos dos pontos P0, P1, P2 e P3. Conforme relatado anteriormente, esses pontos sofrem o impacto pelo aporte de matéria orgânica através do efluente do sistema de tratamento de esgoto do município. Assim, pode-se inferir que além da pressão seletiva que favorece a propagação do fenômeno de resistência entre as comunidades bacterianas no ambiente aquático (HIRSCH et al., 2006), o despejo de esgoto nesses pontos contribui para o surgimento da multirresistência. Esses resultados divergem dos resultados obtido para as áreas de recreação em um estudo desenvolvido por França et al. (2014) e do estudo análogo desenvolvido em águas de recreação marinha por Mudryk (2005).

Para alguns autores (LOBOVA et al., 2002) elevados números de bactérias multirresistentes, pode ocorrer tanto no período de chuvas, quanto no período seco, em virtude do transporte alóctone, ocasionado inclusive pela frequência de turistas, quanto pela quantidade de chuvas ou despejos de esgotos.

Nesse estudo, constataram-se as seguintes bactérias multirresistentes: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter asburiae*, *Escherichia coli* e *Providencia sp.* Para Sousa et al. (2019), a *Klebsiella pneumoniae* é um microrganismo multirresistente, sendo considerada um patógeno oportunista, ocasionando diversos tipos de infecções. Rossi et al. (2015) estudaram a evolução do perfil de resistência antibacteriana de *Klebsiella pneumoniae* em um hospital universitário de Londrina entre 2000 a 2011. Os resultados demonstraram uma mudança significativa nos níveis de múltipla resistência.

Em um estudo desenvolvido por Elias et al. (2015), cujo objetivo foi verificar o perfil de susceptibilidade antibacteriana em uroculturas de um hospital universitário no Estado do Ceará, foi observado múltipla resistência para a *Enterobacter asburiae*, apoiando o estudo em tela.

Segundo a literatura, a *Escherichia coli* vem apresentando, de forma significativa, um aumento de múltipla resistência em isolados de vários ecossistemas (FARS et al., 2005). Assim, a ocorrência para multirresistência desse isolado bacteriano encontrada, corrobora com o estudo desenvolvido por

Vasconcelos et al. (2010), que caracterizaram a resistência antimicrobiana de 43 cepas de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio na cidade de Fortaleza, Ceará.

Ainda conforme a tabela 2, verifica-se a múltipla resistência do isolado de *Providencia sp.*, obtendo o maior índice de MAR (50 %). Esse gênero compreende o grupo de bactérias que ocasionam infecções relacionadas à assistência à saúde (BRASIL, 2013). O perfil de susceptibilidade dessa bactéria tem sido bastante estudado em animais. Entretanto, muitos são os trabalhos que identifica a presença desse microrganismo em água, dentre eles, destaca-se o de Oliveira et al. (2012), que avaliaram a qualidade da água e identificaram bactérias Gram-negativas isoladas do arroio dilúvio, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Em relação às características morfotintoriais, verificou-se que 66,66 % dos isolados bacterianos pertenciam ao grupo das bactérias Gram-negativas e 33,34 % ao grupo das bactérias Gram-positivas, reforçando o estudo de Nascimento et al. (2016), onde encontraram maior prevalência (97 %) de bactérias Gram-negativas dos isolados de importância médica, oriundos da água de reservatórios do semiárido potiguar.

Ignorado as estações e os pontos de coletas, a maior diversidade de bactérias Gram-negativas foi representada pelas enterobactérias com maior ocorrência (61%); no grupo de bactérias Gram-positivas, constatou-se a prevalência de *Staphylococcus sp.* (41%). Os resultados relativos à identificação das bactérias isoladas nos pontos de coletas estudados, utilizando a técnica MALDI-TOF/MS, estão dispostos na tabela 3.

Segundo Rahi et al. (2016), a técnica do MALDI-TOF, empregando a espectrometria de massas, é mais utilizada na área clínica em relação à área ecológica. Tal fato, diminui a quantidade de estudos e o banco de dados relacionados à microbiologia ambiental. Contudo, a utilização desta técnica para identificação de bactérias, minimiza significativamente a ocorrência de erros na interpretação dos resultados baseados em características fenotípicas, oriundas de testes bioquímicos e de microscopia (CHENG et al., 2016).

Nesse estudo, em função de limitações ocasionadas pelo período da Pandemia, como o isolamento social, foram identificadas 16 espécies de bactérias e 5 gêneros (tabela 3). Esses resultados, revelaram que a espécie bacteriana designada comum, identificada com maior frequência no período seco foi a *Klebsiella pneumoniae*, presente nos pontos P0, P1, P2, P3 e P4 (22, 58 %), seguida de *Staphylococcus sp.* encontradas nos pontos P1, P3, P4 e P6 com frequência de 16,13 %. Todavia, no período chuvoso, observaram-se maiores frequência, considerando comum *Staphylococcus sp.* (33,33 %) presentes nos pontos P0, P2, P4, P5 e P6 e a espécie *Escherichia coli*, com frequência de 14,81 %, nos pontos P1, P2 e P3. Assim, não houve espécies consideradas constantes nesse estudo, dado que nenhuma das espécies e dos gêneros identificados, não obtiveram frequência de ocorrências maiores que 50 %.

Conforme a tabela 3, em relação à diversidade de espécies, constatou-se que o ponto P1 apresentou a maior diversidade, seguido do ponto P2 e P5 no período seco. Já no período chuvoso, a diversidade de espécie foi maior nos pontos P2 e P5. Tal fato, pode estar associado ao lançamento de esgotos, constituído por material fecal de origem humana ou animal, nos pontos mencionados.

Baseado na frequência de ocorrência, foram identificadas como sendo raras as espécies *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Alcaligenes faecalis*,

Chromobacterium violaceum, *Escherichia coli*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter asburiae*, *Kocuria kristinae*, *Bacillus pumilus* e *Salmonella typhi* e *Salmonella* sp. no período seco. Já no período chuvoso, as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter kobei*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas otitidis*, *Pseudomonas citronellolis* e *Providencia* sp., *Shigella* sp. e *Acinetobacter* sp. no período chuvoso.

Ainda conforme a tabela 3, fica evidente a identificação das espécies de bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter kobei*, *Bacillus pumilus*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus* sp. em ambos os períodos (seco e chuvoso) de coletas avaliados.

Embora algumas bactérias identificadas em ambos os períodos, foram designadas raras, a presença dessas bactérias nos pontos de estudo, bem como as bactérias comumente presentes nesses pontos, torna-se inquietante, pois foi constatado a presença de bactérias consideradas potencialmente patogênicas, como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella* sp. Segundo Nascimento et al. (2016), a presença dessas bactérias nas águas, sujeitam os usuários desses mananciais a riscos elevados de saúde pública.

Tabela 3: Bactérias identificadas nos pontos de coletas estudados e suas respectivas frequência de ocorrência.

Bactérias Identificadas	Período Seco		Período Chuvoso	
	PCI*	Percentual	PCI*	Percentual
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P0, P1, P2, P3 e P4	22,58	P1	3,70
<i>Bacillus cereus</i>	P0	3,22	----	----
<i>Micrococcus luteus</i>	P0	3,22	----	----
<i>Bacillus megaterium</i>	P1 e P2	6,45	----	----
<i>Staphylococcus</i> sp.	P1, P3, P4 e P6	16,13	P0, P2, P4, P5 e P6	33,33
<i>Enterococcus faecalis</i>	P1 e P5	6,45	----	----
<i>Alcaligenes faecalis</i>	P1 e P4	6,45	----	----
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P2 e P5	6,45	P0 e P5	7,40
<i>Escherichia coli</i>	P1 e P5	6,45	P1, P2 e P3	14,81
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	P2	3,22	----	----
<i>Salmonella</i> sp.	P3	3,22	----	----
<i>Enterobacter kobei</i>	P5	3,22	P2	3,70
<i>Enterobacter asburiae</i>	P1	3,22	----	----
<i>Kocuria kristinae</i>	P6	3,22	----	----
<i>Bacillus pumilus</i>	P6	3,22	P0 e P6	14,81
<i>Salmonella typhi</i>	P1	3,22	P2	3,70
<i>Pseudomonas otitidis</i>	----	----	P1	3,70
<i>Providencia</i> sp.	----	----	P2	3,70
<i>Shigella</i> sp.	----	----	P3	3,70
<i>Acinetobacter</i> sp.	----	----	P3	3,70
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	----	----	P4	3,70

* Ponto de coleta identificada

É importante frisar que, *E. coli* são consideradas indicadores ambientais da qualidade das águas (SOUZA et al., 2014). Assim, torna-se necessário o monitoramento constante das águas da microbacia do Rio Branco, uma vez que foi constatada a presença desse microrganismo nesse estudo, em cinco dos sete pontos de coletas. Esse resultado, corrobora com o estudo realizado por Malagi et al. (2020), em que avaliaram a qualidade das águas utilizadas para recreação e abastecimento público de seis rios da cidade de Cascavel, PR. Os resultados demonstraram a presença de *E. coli* em todos os rios analisados, possuindo inclusive, resistência a todos os antibacterianos empregados.

Bergeron et al. (2015) avaliaram a presença de bactérias resistentes a antibacterianos e genes de

resistências a antibacterianos em uma fonte de água bruta, água potável tratada, na linha de distribuição e em uma estação de tratamento de água rural na Louisiana, EUA. Os resultados, mostraram a presença de várias bactérias na fonte de água, dentre as quais *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* spp., apoiando o estudo aqui desenvolvido.

Geralmente, os resultados da identificação das bactérias nesse estudo, validam com os resultados relatados por Nascimento et al. (2016) que avaliando a contaminação da água de reservatórios (que também são classificadas como águas superficiais) do semiárido potiguar por bactérias de importância médica, identificaram muitos dos mesmos microrganismos encontrados em nosso estudo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram diferença significativa entre os períodos seco e chuvoso em relação à qualidade físico-química e microbiológica da água nos diferentes pontos coletados da microbacia do Rio Branco, RR, ocorrendo maiores resultados desfavoráveis para o ponto P1, com turbidez elevada e baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido.

Não há uma relação entre a densidade de bactéria heterotrófica e o perfil de resistência. Contudo, considerando os isolados, verificou-se que as bactérias identificadas nos pontos P0, P1, P2, P3 e P5 apresentaram resistência ao antibacterianos amicacina, amoxicilina, azitromicina e ciprofloxacino.

Bactérias isoladas dos pontos P0, P1, P2, P3, apresentaram um perfil de multirresistência, demonstrando a urgente execução de medidas com objetivo de controlar a dispersão dessas bactérias e de seus genes de resistência nas águas da microbacia do Rio Branco.

A identificação dos microrganismos, revelaram a presença de bactérias patogênicas que ocasionam doenças de veiculação hídrica, fato que urge a necessidade de estudos aprofundados sobre a identificação e o perfil de susceptibilidade das bactérias presentes em outros rios e igarapés de Roraima.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, F. V.; VIEIRA, L.; JAYME, M. M. A.; NUNES, M. C.; CORTÊS, M.. Avaliação da qualidade da água utilizada para irrigação na bacia do Córrego Sujo, Teresópolis, RJ. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v.23, p.380-385, 2015. DOI:

<http://doi.org/10.1590/1414-462X201500040083>

BERGERON, S.; BOOPATHY, R.; NATHANIEL, R.; CORBIN, A.; FLEUR, G.. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.102, p.370-374, 2015. DOI:

<http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.017>

BORTOLOTTI, K. C. S.; MELLONI, R.; MARQUES, P. S.; CARVALHO, B. M. F.; ANDRADE, M. C. A.. Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.23, n.4, p.717-725, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1413-41522018169903>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento**

do Uso de antimicrobianos em Serviços de Saúde. Brasília: ANVISA, 2017.

BRASIL. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília: DOU, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000**. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. nº 18, de 25 de janeiro de 2001. Ministério do Meio Ambiente, 2000.

CARVALHO, A. P. D.; BALDUÍNO, A. R.; MACIEL, G. F.; PICANÇO, A. D.. Avaliação da poluição em rios utilizando índices de qualidade da água: um estudo de caso no Ribeirão São João em Porto Nacional–TO. **Revista de Geociências**, Maceió, v.35, n.3, p.472-484, 2016.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCIA, T.; MACEDO, A. J.. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Porto Alegre, v.11, n.16, p.183-190, 2010. DOI:

<http://doi.org/10.31514/rliiberato.2010v11n16.p183>

CHENG, K.; CHUI, H.; DOMISH, L.; HERNANDEZ, D.; WANG, G.. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. **Proteomics-Clinical Applications**, v.10, n.4, p.346–357, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1002/prca.201500086>

COSTA, W. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; MELLO, R. R.; MARQUES, A. A. A.; AJUZ, T. M. L.; SANTOS, E. D.; SANTOS, L. S.; VIVI, V. K.. Análise bacteriológica da água e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das escherichia coli isoladas. **Journal Health NPEPS**, Cuiabá, v.1, n.2, p.160-177, 2016.

ELIAS, D. B. D.; RIBEIRO, D. B. D.. Perfil de sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de um hospital universitário do estado do Ceará no período de janeiro a junho de 2015. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v.49, n.4, p.381-389, 2015. DOI: <http://doi.org/10.21877/2448-3877.201700580>

ESBEL, D. M.. **Influência do deságue do sistema de lagoas de estabilização na quantidade de nutrientes no igarapé Grande**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.

FARS, S.; NEJMEDDINE, A.; HASSANI, L.; MELLOUL, A. A.; BOUSSELHAJ, K.; AMAHMID, O.; BOUHOUM, K.; LAKMICH, H.; MEZRIQUI, N.. Antibiotic resistance and survival of faecal coliforms in activated sludge system in a semi-arid region (Beni Mellal, Morocco). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.493-500, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11274-004-2613-6>

FRANÇA, P. T. R.; MELLONI, R.. Avaliação microbiológica de águas de recreação por meio da análise de resistência de bactérias heterotróficas a antibacterianos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos, Porto Alegre**, v.19, n.4, p.107-113, 2014. DOI: <http://doi.org/10.21168/rbrh.v19n4.p107-113>

FUENTEFRÍA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G.. Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.41, n.5, p.470-473, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>

HIRSCH, D.; JUNIOR, D. J. P.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P.. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, p.1211-1217, 2006. DOI: <http://doi.org/10.1590/S1413-70542006000600026>

HORBE, A. M. C.; OLIVEIRA, L. G. S.. Química de igarapés de água preta do Nordeste do Amazonas-Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v.38, n.2, p.753-760, 2008. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400020>

JACOBY, G. A.. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.41, p.120-126, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1086/428052>

LOBOVA, T. I.; BARKHATOV, Y. V.; POPOVA, L. Y.. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in Shira Lake: natural and anthropogenic impacts. **Aquatic Microbiology and Ecology**, Nova York, v.30, p.11-18, 2002.

DOI: <http://doi.org/10.3354/ame030011>

MALAGI, I.; SAMPAIO, S. C.; PINTO, F. G. S.; ROSA, D. M.; REIS, R. R.. Physicochemical quality of and *Escherichia coli* resistance profiles in urban surface waters. **Brazilian Journal of Biology**, v.80, n.3, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1590/1519-6984.218915>

MARTINHAGO, M. W.; BUZANELLO, E. B.; ALMEIDA, M. M.; PINTO, F. G. S.. Avaliação do perfil de susceptibilidade das cepas de *Escherichia coli* isoladas da água do lago municipal de Cascavel, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.6, p.62-62, 2008.

MARTINS, A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, L. O.; LICATE, M. M.; DELAFIORE, C. R.; PÔRTO, S. F.. Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v.10, n.20, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223201900065>

MOURA, A. C.; ASSUMPÇÃO, R. A. B.; BISCHOFF, J.. Monitoramento físico-químico e microbiológico da água do Rio Cascavel durante o período de 2003 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.1, p.17-22, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1590/1808-1657v76p0172009>

MUDRYK, Z. J.. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.50, p.80-86, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.001>

NASCIMENTO, E. D.; MAIA, C. M. M.; ARAÚJO, M. F. F.. Contaminação da água de reservatórios do semiárido potiguar por bactérias de importância médica. **Revista Ambiente & Água, Taubaté**, v.11, n.2, p.414-427, 2016. DOI: <http://doi.org/10.4136/ambi-agua.1801>

OLIVEIRA, D. V.; MEDEIROS, A. W.; NACHTIGALL, G.; SILVA, T. C.; ZANIN, J. G.; FRAZZON, A. P. G.; VAN DER SAND, S. T.. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-negativas isoladas do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência Interdisciplinar**, v.12, n.1, p.51–62, 2012.

OLIVEIRA, J. V. L.; COSTA, F. B.; PORFÍRIO, V. N.; SILVA, M. M. M.; CUNHA, A. B. O. C.; SILVA, N. C.; NASCIMENTO, V. J. O. A.; FRANÇA, A. M. M.; MELO, M. L. R. S.; SILVA, R. F. C.; COSTA, M. D. T.; SILVA FILHO, L. S.. Self-medication in the pandemic period of COVID-19: Integrative review. **Research, Society and Development**, v.10, n.3, p.e58610313762, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13762>

RAHI, P.; PRAKASH, O.; SHOUCHE, Y. S.. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. **Front Microbiol.**, Suíça, v.7, p.1359, 2016. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>

ROSSI, D. J.; RECHENCHOSKI, D. Z.; VIVAN, A. C. P.; DAMBRÓZIO, A. M. L.; GARBIN, R. P. B.; MAGALHÃES, G. L. G.; QUESADA, R. M. B.; MARRONI, F. E. C.; PELISSON, M.; PERUGINI, M. R. E.; VESPERO, E. C.. Evolução da resistência de *Klebsiella pneumoniae* no Hospital Universitário de Londrina no período de 2000 a 2011. **Semina: Ciências**

Biológicas e da Saúde, Londrina, v.36, n.1, p.267-274, 2015.

DOI: <http://doi.org/10.5433/1679-0367.2015v36n1Suplp267>

SATELLES, J. L.; SILVA, H. E. B.; FARIAS, L. R.; PANERO, F. S.. Avaliação dos impactos ambientais da estação de tratamento de esgoto doméstico sobre o Igarapé Grande em Boa Vista/RR. **Periódico Tchêquímica**, Porto Alegre, v.15, n.30, p.160-175, 2018.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V.. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, Florianópolis, v.22, p.11-7, 2009. DOI: <http://doi.org/10.5007/2175-7925.2009v22n3p11>

SOUSA, A. T. H. I.; MAKINO, H.; BRUNO, V. C. M.; CANDIDO, S. L.; NOGUEIRA, B. S.; MENEZES, I. G. NAKAZATO, L.; DUTRA, V.. Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.71, n.02, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1590/1678-4162-10599>

SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; PIANA, P. A.; MOURA, A. C.. Water quality indicators for environmental and resistance profile of *Escherichia coli* strains isolated in Rio Cascavel, Paraná, Brazil. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, SP, n.34, v.2, p.352-362, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0100-69162014000200016>

VASCONCELLOS, F. C. S.; IGANCI, J. R. V.; RIBEIRO, G. A.. Qualidade microbiológica da água do Rio São Lourenço, São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.177-181, 2006.

VASCONCELOS, F. R.; REBOUÇAS, R. H.; BARRETO, N. S. B.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F.. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do Açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.405-410, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1590/1808-1657v77p4052010>

WAMBUGU, P.; HABTU, M.; IMPWI, P.; MATIRU, V.; KIIRU, J.. Antimicrobial susceptibility profiles among *Escherichia coli* strains isolated from Athi river water in Machakos County, Kenya. **Adv. Microbiol**, London, v.5, n.10, p.711-719, 2015. DOI: <http://doi.org/10.4236/aim.2015.510074>

A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detém os direitos materiais desta publicação. Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas sob coordenação da **Sustenere Publishing**, da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.

**4 GREEN AND FAST METHOD FOR IDENTIFYING SURFACE WATER BACTERIAL ISOLATES
USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE ANALYSIS**

Communication

Green and fast method for identifying surface water bacterial isolates using near-infrared spectroscopy and multivariate analysis

 Leovergildo Farias ^{1,*}, Francisco Panero ^{1,*}, Ana Paula Correa ¹, Jordana Riss ¹, and Marcos Vital ¹
¹ Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT), Boa Vista, Roraima, Brazil; coord.pronat@prppg.ufrr.br

* Correspondence: leovergildofarias@yahoo.com.br; francisco.panero@ufrr.br

Abstract: Near-infrared spectroscopy (NIR) has been used as an alternative technique for molecular identification and has made the process faster and cheaper. This work reports a new way of identifying bacteria isolated from surface waters and a way of separating bacteria into Gram-positive and Gram-negative groups. The identification of the isolates was performed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) method and the green and fast method was developed through the use of NIR spectroscopy using a BOMEM MD-1600 spectrophotometer equipped with a diffuse reflectance accessory, with a resolution of 8 cm⁻¹, in the spectral region from 14,000 to 4,000 cm⁻¹ (714 to 2,500 nm). 20 spectral averages were read from each bacterial sample and, via the application of principal component analysis-PCA and the hierarchical clusters analysis. The results obtained allow us to conclude that NIR spectroscopy permits the identification of bacteria and groups of bacteria in a fast, accurate and non-invasive way, both for the reference standards and for bacteria isolated from surface waters of the Branco River microbasin.

Keywords: Near-Infrared; Multivariate Analysis; Bacteria; Water.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Molecules* **2022**, *27*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bacteria are defined as prokaryotic microorganisms, which are unicellular organisms that do not have a nuclear membrane, mitochondria, Golgi complex or endoplasmic reticulum, and whose reproduction occurs via asexual division [1]. Its classification is made by means of its macroscopic and microscopic appearance, by the characterization of its growth, by its metabolic properties, by its antigenicity and even by its genotype.

Regarding the methods of identification of bacteria, the scientific literature describes the classic methods of culture that consist of the morphological analysis of cells or colonies, use of staining, verification of the growth and use of biochemical tests, which are considered accurate and have high sensitivity. Preliminary identification usually takes up to 48 h to 72 h and, sometimes, confirmation of the pathogen species takes more than a week.

Currently, laser-assisted matrix desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been implemented as a method for identifying bacteria [2], and is considered a very fast and highly accurate method, since the analysis time is up to 15 minutes [3]. However, the main limitation of MALDI-TOF MS is the high price of the equipment [4].

Although MALDI-TOF is a fast and efficient identification method, this method still lacks the sample processing step and employs substances that generate risks for the environment and the health of the laboratory staff [5,6]. In this sense, it is necessary to develop new identification methods that excel in practicality, economy, generate less waste and which do not pose risks to the analyzing equipment.

Based on the Gram staining technique, bacteria are classified into two categories: Gram-positive, which includes bacteria that have an extensive peptidoglycan cell wall and are stained purple by crystal violet after the laboratory technique, and Gram-negative, which have a polysaccharide outer membrane exclusive to this type of bacteria. This latter class of bacteria loses the crystal violet-iodine complex during discoloration with alcohol washing, but retains safranin, and appears reddish or pink after laboratory tests [1,7].

Methods using infrared and Raman microspectrometry are also being developed and have shown excellent results for the discrimination of microorganisms. An alternative method of molecular identification is the use of infrared spectroscopy, especially near-infrared spectroscopy (NIR) [8]. The use of this technique provides benefits such as speed, low cost of equipment and operation. According to Krepelka *et al.* (2014), the use of NIR may be one of the most appropriate methods for identifying bacteria due to its speed, and is widely disseminated in the area of analytical chemistry, with a significant interest in the use of the technique in microbiology being observed.

In this sense, knowing the microbiological quality of water resources, through the identification of pathogenic bacteria, makes it possible to understand the environmental impacts caused by the contamination of these resources, especially in regions lacking research related to bacterial identification, such as the microbasin of the Branco River, which is located in the municipality of Boa Vista, Roraima, Brazil.

Thus, considering the lack of studies in the Amazon, specifically in the Branco River microbasin, the objective of this research was to apply NIR spectroscopy and multivariate analysis in order to identify the pathogenic microorganisms *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhi*, isolated from water samples of the Branco River microbasin, located in the state of Roraima, in the extreme north of the Amazon.

2. Results

2.1 Authentication of bacteria ATCCs

The raw spectra (without pretreatment) in the near-infrared (NIR) region of the bacteria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700 603), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634), between 700 and 2500 nm, are represented in Figure 2.

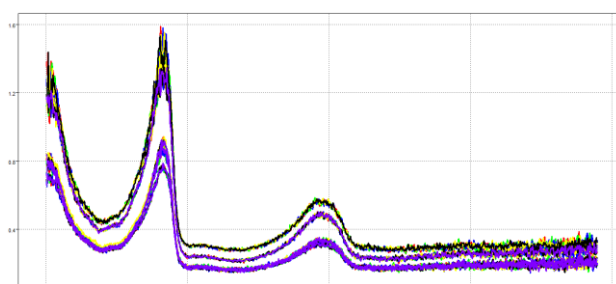


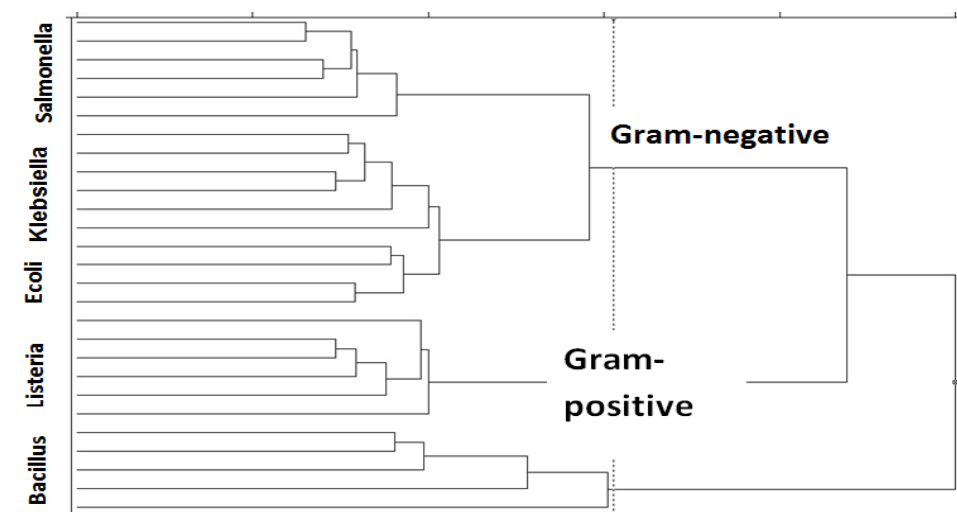
Figure 2. NIR spectra without pretreatment of the bacteria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700 603), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634), between 700 and 2500 nm.

The different colored lines represent the spectra of each sample. Note that, due to the overlap, it is not possible to perceive the difference between the samples. Therefore, it is necessary to perform pre-processing of the spectral signals in order to remove or soften the spectral noise, the rise in the baseline and the effect of light mirroring due to diffuse reflectance, via a number of mathematical methods, for the authentication of the bacteria.

The dendrogram resulting from the application of the hierarchical cluster analysis (HCA) technique showed that the best result was obtained with data treatment centered

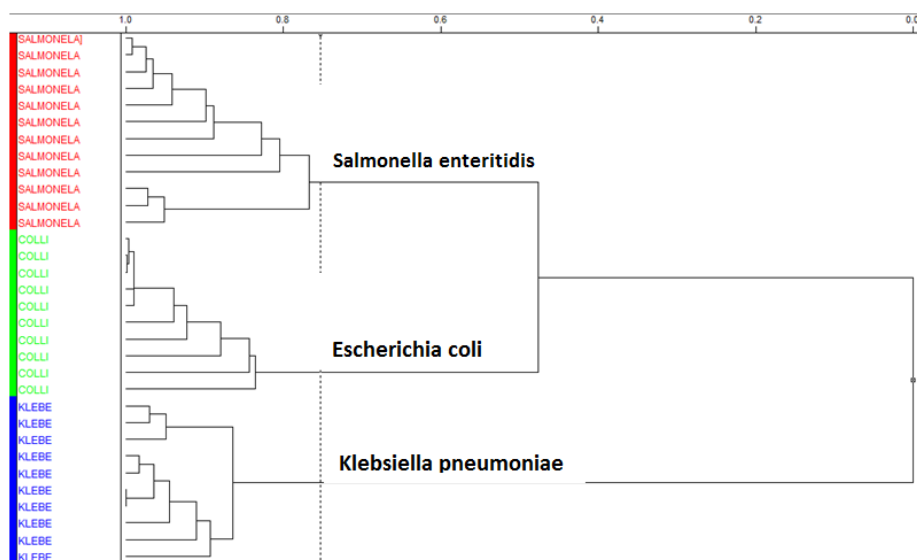
on the mean, Euclidean metric distance and incremental linkage algorithm, as a grouping rule. It is necessary to first perform smoothing in the light scattering through the application of the standard normal variation transformation (SNV) and Savitzky–Golay smoothing filters (number of points: 25) to the spectra.

Figure 3 shows the dendrogram resulting from the application of hierarchical clustering analysis (HCA) to the NIR spectral data of the bacteria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700 603), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634). The technique was successful with the use of spectral treatment, with data centering on the mean, Euclidean metric distance and incremental linkage algorithm, as a grouping rule associated with the application of the standard normal variation transformation (SNV) and Savitzky–Golay smoothing filters. In this figure, it is possible to observe the separation of five groups of bacteria, thus demonstrating the use of NIR in the authentication/identification of these bacteria. It was also possible to observe the formation of two large clusters, namely Gram-negative (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 10536)) and Gram-positive (*Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634)) bacteria.

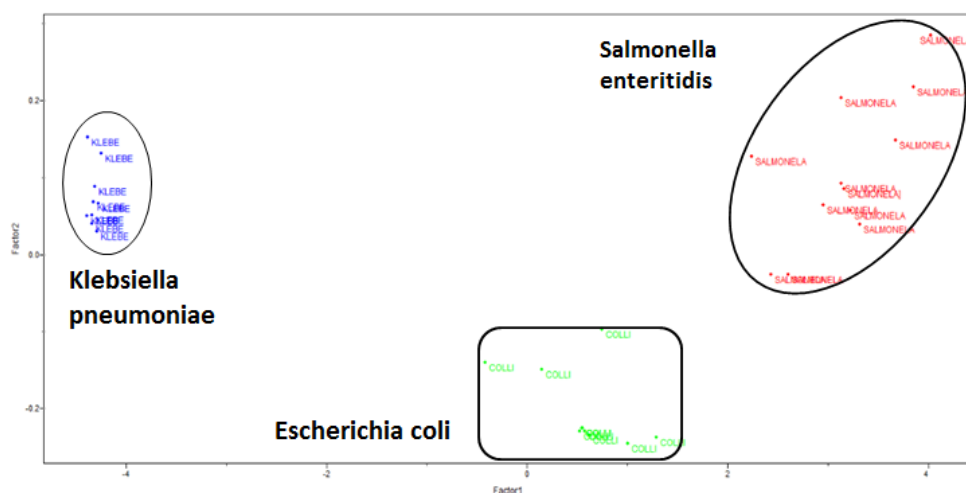


After the application of NIR spectroscopy had shown good results in the identification and authentication of certified bacteria, the identification tests of bacteria contained in the water were performed, and these were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS).

Figure 4 shows the dendrogram resulting from the application of hierarchical clustering analysis (HCA) to the NIR spectral data of the bacteria *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. These bacteria were identified in raw water samples collected from the Branco River microbasin (Amazon region). It is possible to observe the formation of three large clusters, thus evidencing the reliability of the NIR technique in the identification of these bacteria.



The principal component analysis (PCA) technique was also applied, with the use of two principal components, which were responsible for describing 99.65% of the total variance, with 99.41% attributed to PC1 and 0.24% to PC2. According to the graph of scores presented in Figure 5, the separation of three large groups can be observed, which refer to the identification of the bacteria *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, in accordance with the result obtained by the HCA.



3. Materials and Methods

3.1 Isolation and identification of bacteria

Samples of raw water, collected from the Branco River microbasin, were diluted in 0.85 % saline solution to 10^{-4} μ L and inoculated onto the surface of a plate containing a plate count agar (PCA) culture medium. The plates were incubated at 35 °C and the colonies were counted after 24 and 48 hours of incubation.

The colonies of heterotrophic bacteria were counted, and only the dilutions that presented between 30 and 300 colonies per plate were considered, with the result being expressed in colony forming units per mL (CFU/mL) [9]. After counting, the bacteria were initially grouped according to the following macromorphological characteristics: color, edge, shine, creaminess and elevation. Then, colonies were coded according to the collection site. After coding, one colony of each code was selected and a pure culture was obtained. To obtain a pure culture of heterotrophic bacteria, the surface depletion technique was used using BHI medium and the culture was then incubated at 35 °C for 24 hours.

3.2 Reactivation of bacterial standards

In order to verify the reliability of the bacteria identification process using near-infrared spectroscopy, seven strains of the following bacteria were used as the reference: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700 603), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Bacillus cereus* (ATCC 9634). These strains were obtained from the collection of the Federal University of Rio Grande do Sul and the Federal University of Roraima. These strains were reactivated in brain heart infusion (BHI) broth.

3.3 Identification of bacteria using MALDI-TOF

The analyses were performed using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS). This technique was performed using chemical extraction, according to the ethanol/formic acid protocol, in which the isolates were cultivated in a BHI medium at 37 °C for 24 hours, and approximately 5 to 10 mg of material were used for analysis.

The identification of the bacteria was carried out at the Microbiology Laboratory of the Instituto de Ciências Básicas da Saúde at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), using the MALDI equipment (Bruker, Biotyper 4.0), equipped with the MBT OC software, and employed the mass spectrometry technique.

4. Conclusions

The technique of infrared spectroscopy in the near region using diffuse reflectance, associated with the unsupervised pattern recognition techniques (principal component analysis and hierarchical cluster analysis), was able to classify/identify five different types of bacteria, in addition to classifying them into two categories: Gram-positive, and Gram-negative. In addition to discriminating quickly, non-destructively and efficiently, this was performed without the use of reagents and the generation of harmful residues, thus helping to preserve the environment.

References

- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Medical Microbiology. 8. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016, 932 p.
- DAVIES, Y. M. et al. Uso de MALDI-TOF para identificação e vigilância de bactérias gram-negativas em psitacídeos selvagens em cativeiro. Braz. J. Biol., São Carlos, v. 82, p. 233523, 2022.
- PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. Einstein (São Paulo) [online]. 2012, v. 10, n. 1, pp. 118-119.
- BARBOSA, K. H. et al. Impact of MALDI-TOF in the diagnosis of Sepsis: an integrative. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 6, p. 58556-58574, 2021.
- SIMON, L. et al. Direct identification of 80% of bacteria from blood culture bottles by MALDI -TOF MS using a 10-minute extraction protocol. Journal of Clinical Microbiology. v. 57, p.e01278-18, 2019.
- TANNER, H. et al. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. BMC Research Notes. v. 10, n. 48, 2017.
- Beveridge TJ. Mechanism of gram variability in select bacteria. J Bacteriol. 1990 Mar;172(3):1609-20. doi: 10.1128/jb.172.3.1609-1620.1990. PMID: 1689718; PMCID: PMC208639.
- KREPELKA, P.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; BARTUSEK, K. Bacterial pattern identification in near-infrared spectrum. Informatyka, Automatyka, Pomiary w Gospodarce i Ochronie Środowiska, n. 3, p. 58--60, 2014.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Standard Methods of Examination of Water and Wastewater. 23. ed. New York: American Water Works Association, 2017, 1360p.

4.1 NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS NA REVISTA MOLECULES

Disponível no link: <https://www.mdpi.com/journal/molecules/instructions#preparation>

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title

Firstname Lastname ¹, Firstname Lastname ² and Firstname Lastname ^{2,*}

¹ Affiliation 1; e-mail@e-mail.com

² Affiliation 2; e-mail@e-mail.com

* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corresponding authors, add author initials)

Abstract: A single paragraph of about 200 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: briefly describe the main methods or treatments applied; (3) Results: summarize the article's main findings; (4) Conclusions: indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article and it must not contain results that are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (List three to ten pertinent keywords specific to the article yet reasonably common within the subject discipline.)

0. How to Use This Template

The template details the sections that can be used in a manuscript. Note that each section has a corresponding style, which can be found in the "Styles" menu of Word. Sections that are not mandatory are listed as such. The section titles given are for articles. Review papers and other article types have a more flexible structure.

Remove this paragraph and start section numbering with 1. For any questions, please contact the editorial office of the journal or support@mdpi.com.

1. Introduction

The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The current state of the research field should be carefully reviewed and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the principal conclusions. As far as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists outside your particular field of research. References should be numbered in order of appearance and indicated by a numeral or numerals in square brackets—e.g., [1] or [2,3], or [4–6]. See the end of the document for further details on references.

2. Results

This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation, as well as the experimental conclusions that can be drawn.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Molecules* **2022**, *27*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.1. Subsection	41
2.1.1. Subsubsection	42
Bulleted lists look like this:	43
• First bullet;	44
• Second bullet;	45
• Third bullet.	46
Numbered lists can be added as follows:	47
1. First item;	48
2. Second item;	49
3. Third item.	50
The text continues here.	51
2.2. Figures, Tables and Schemes	52
All figures and tables should be cited in the main text as Figure 1, Table 1, etc.	53



Figure 1. This is a figure. Schemes follow the same formatting.

Table 1. This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited.

Title 1	Title 2	Title 3
entry 1	data	data
entry 2	data	data ¹

¹ Tables may have a footer.

The text continues here (Figure 2 and Table 2).

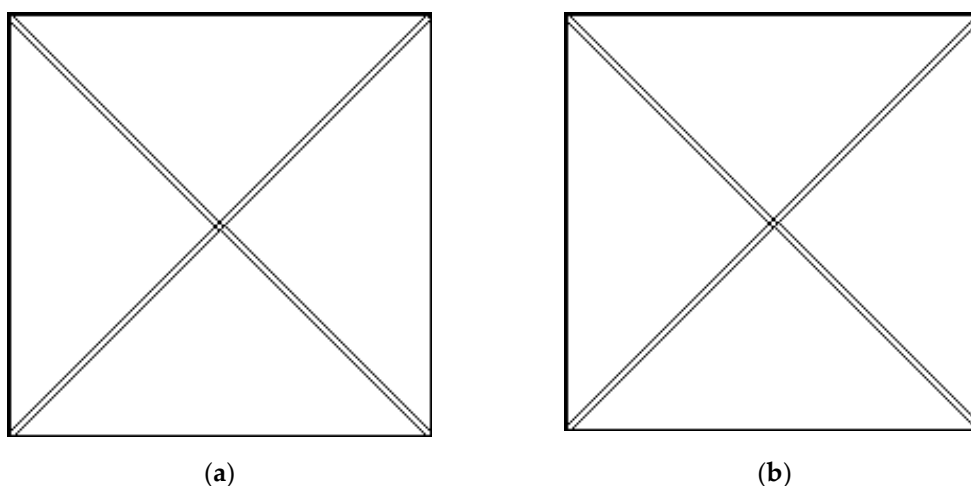


Figure 2. This is a figure. Schemes follow another format. If there are multiple panels, they should be listed as: (a) Description of what is contained in the first panel; (b) Description of what is contained in the second panel. Figures should be placed in the main text near to the first time they are cited. A caption on a single line should be centered.

Table 2. This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited. 63

Title 1	Title 2	Title 3	Title 4
entry 1 *	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 2	data	data	data
	data	data	data
entry 3	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 4	data	data	data
	data	data	data

* Tables may have a footer. 64

2.3. Formatting of Mathematical Components 65

This is example 1 of an equation: 66

$$a = 1, \quad (1)$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text. 67

This is example 2 of an equation: 69

$$a = b + c + d + e + f + g + h + i + j + k + l + m + n + o + p + q + r + s + t + u + v + w + x + y + z \quad (2)$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text. 70

Theorem-type environments (including propositions, lemmas, corollaries etc.) can be formatted as follows: 72

Theorem 1. *Example text of a theorem. Theorems, propositions, lemmas, etc. should be numbered sequentially (i.e., Proposition 2 follows Theorem 1). Examples or Remarks use the same formatting, but should be numbered separately, so a document may contain Theorem 1, Remark 1 and Example 1.* 74

The text continues here. Proofs must be formatted as follows: 77

Proof of Theorem 1. Text of the proof. Note that the phrase “of Theorem 1” is optional if it is clear which theorem is being referred to. Always finish a proof with the following symbol. □ 78

The text continues here. 81

3. Discussion 82

Authors should discuss the results and how they can be interpreted from the perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted. 83

4. Materials and Methods 87

The Materials and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on the published results. Please note that the publication of your manuscript implicates that you must make all materials, data, computer code, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission 88

stage any restrictions on the availability of materials or information. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited.

Research manuscripts reporting large datasets that are deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

Interventionary studies involving animals or humans, and other studies that require ethical approval, must list the authority that provided approval and the corresponding ethical approval code.

5. Conclusions

This section is not mandatory but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.

6. Patents

This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

Institutional Review Board Statement: In this section, you should add the Institutional Review Board Statement and approval number, if relevant to your study. You might choose to exclude this statement if the study did not require ethical approval. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add “The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” for studies involving humans. OR “The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” for studies involving animals. OR “Ethical review and approval were waived for this study due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable” for studies not involving humans or animals.

Informed Consent Statement: Any research article describing a study involving humans should contain this statement. Please add “Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.” OR “Patient consent was waived due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable.” for studies not involving humans. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans.

Written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Please state “Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper” if applicable.

Data Availability Statement: In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics>. If the study did not report any data, you might add “Not applicable” here.

Acknowledgments: In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state “The authors declare no conflict of interest.” Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state “The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results”.

Sample Availability: Samples of the compounds ... are available from the authors.

Appendix A

The appendix is an optional section that can contain details and data supplemental to the main text—for example, explanations of experimental details that would disrupt the flow of the main text but nonetheless remain crucial to understanding and reproducing the research shown; figures of replicates for experiments of which representative data is shown in the main text can be added here if brief, or as Supplementary data. Mathematical proofs of results not central to the paper can be added as an appendix.

Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendices, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with “A”—e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

References

References must be numbered in order of appearance in the text (including citations in tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. Include the digital object identifier (DOI) for all references where available.

Citations and references in the Supplementary Materials are permitted provided that they also appear in the reference list here.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [] and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10), or [6] (pp. 101–105).

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range. 181
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196. 182
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196. 184
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication (submitted; accepted; in press)*. 185
5. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, 2012. 187
6. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference (Day Month Year). 188
7. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion. 190
8. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year). 191

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo sobre os contaminantes emergentes cafeína e amoxicilina e o perfil de susceptibilidade de bactérias na microbacia do Rio Branco, em Boa Vista, Roraima, permitiram concluir que:

1. A identificação e quantificação dos contaminantes emergentes cafeína e amoxicilina foi pioneira em Roraima, demonstrando a dispersão desses contaminantes na microbacia do Rio Branco;
2. As maiores concentrações foram quantificadas no período de chuvas tanto para cafeína quanto para amoxicilina, sendo a cafeína detectada e quantificada em maior frequência;
3. A qualidade da água da microbacia do Rio Branco é comprometida pelo aporte de contaminantes emergentes oriundos do município de Boa Vista por meio de esgotos domésticos, aumentando o fenômeno da resistência bacteriana a alguns contaminantes emergentes, principalmente aos antibacterianos;
4. Há, nas águas superficiais, bactérias resistentes, inclusive à amoxicilina, em alguns dos pontos estudados, sendo identificada a presença de bactérias patogênicas que causam doenças de veiculação hídrica;
5. A técnica de infravermelho próximo, associada a análise multivariada, demonstrou ser um método de identificação de bactérias eficiente, rápido e de diminuto custo, possibilitando o agrupamento de bactérias, conforme sua parede celular;
6. Os órgãos ambientais devem alertar à população sobre a presença de fármacos nas águas superficiais da microbacia do Rio Branco, o qual possui o ponto de captação da água destinada à abastecimento humano após tratamento à parte da população de Boa Vista;
7. O desenvolvimento urbano, ocasionado de forma ineficiente e/ou ausente de políticas públicas voltadas para a preservação dos recursos hídricos é o responsável pela qualidade das águas superficiais estudadas;
8. Faz-se necessário um programa de monitoramento amplo, englobando a investigação e quantificação de outros contaminantes emergentes, bem como, a continuidade de se avaliar o perfil de susceptibilidade de microrganismos presentes nas águas superficiais de Roraima, pois são poucos os artigos científicos publicados que tenham estudado essas propostas no extremo norte da Amazônia.

REFERÊNCIAS

- DULLEY, Richard Domingues. Noção de natureza, ambiente, meio ambiente, recursos ambientais e recursos naturais. **Agricultura em São Paulo, São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 15-26, 2004.
- FALCÃO, M. T. et al. Impactos ambientais no igarapé Wai Grande em Boa Vista-Roraima decorrentes da influência do aterro sanitário. **Revista Geonorte**, Manaus, v. 3, n. 4, p. 199-207, 2012.
- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, São Paulo, v. 40, n. 9, p. 1094-110, 2017.
- SILVA, V. F.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Contaminação de efluentes por amoxicilina: consequências ambientais e métodos de remoção. **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 2, p. 6-13, 2022.
- TONELLO, M. F. et al. Situação ambiental do igarapé Mirandinha (canalização). **ACTA GEOGRÁFICA**, Boa Vista, v. 2, n. 4, p. 41-55, 2010.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. **Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products**. Disponível em: <http://www.epa.gov/esd/bios/pdf/contaminants-biosolids2.pdf> . Acesso 15 mar. 2022.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA, UFRR. **Resolução nº 008/2017 – CEPE que aprova as Normas para Apresentação dos Trabalhos Técnico Científicos da UFRR**. Disponível em: <https://ufrr.br/bibliotecas/destaques/124-manual-de-normas> Acesso em 01 de ago. de 2022.