



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

ÁLEF VASCONCELOS RIBEIRO

**CO-SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM BACTÉRIAS AMBIENTAIS**

FORTALEZA

2019

ÁLEF VASCONCELOS RIBEIRO

CO-SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM BACTÉRIAS AMBIENTAIS

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof. Dra Oscarina Viana de Sousa
Co-orientadora: Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R372c Ribeiro, Álef Vasconcelos.
Co-Seleção de Resistência a Antimicrobianos Induzida por Exposição a Pesticidas em Bactérias Ambientais / Álef Vasconcelos Ribeiro. – 2019.
70 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Coorientação: Prof. Dra. Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

1. Agrotóxicos. 2. Antibióticos. 3. Resistência cruzada. 4. Herbicidas. I. Título.

CDD 333.7

ÁLEF VASCONCELOS RIBEIRO

CO-SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS INDUZIDA POR
EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS EM BACTÉRIAS AMBIENTAIS

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Marina Teresa Torres Rodriguez
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, em especial à minha mãe, por me dar todo amor, carinho e incentivo ao longo da vida.

Ao meu pai e madrasta por sempre me apoiarem e me ajudarem ao longo da graduação.

Aos meus irmãos por toda ajuda, incentivo e por acreditarem no meu potencial.

Ao meu primo Marcelo Geison, por sempre se fazer presente e me ajudar como pode.

À minha tia Goretti Silva, por toda ajuda e apoio durante a graduação.

À Universidade Federal do Ceará, pela experiência e por todo aprendizado sendo fundamental na formação do ser humano que sou hoje.

À professora Danielle Garcez, pela orientação ao longo da bolsa de iniciação científica e por todo aprendizado.

À professora Oscarina Viana, por ter me dado a oportunidade de estagiar no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), onde me encantei pelo mundo da microbiologia. Por se mostrar sempre acessível todas as vezes que precisei de ajuda e por ser, além de uma orientadora, uma mãe para com todos que fazem parte da família LAMAP. Muito obrigado <3.

À minha avó de laboratório Cristiane Teles, por ser tão divertida e tornar os dias no laboratório mais agradáveis. Por se mostrar sempre preocupada com o bem estar de todos e sempre me fazer acreditar que vai dar certo. Por toda ajuda, incentivo e por me mostrar que “a lei de Murphy existe” e que “Deus é pai não é padrasto”. Sem sua ajuda, esse trabalho não teria sido executado. Muito obrigado <3.

A todos que fazem parte da família LAMAP, em especial à minha mãe de laboratório Jade Abreu por todos os ensinamentos e dúvidas tiradas quando precisei, à Jéssica Lucinda e Marina Torres por toda ajuda e orientação ao longo do trabalho, à Anna Brito por sempre estar disposta a me ajudar sempre que precisei, à Gleire Menezes por cada palavra de incentivo, à Alexandra Almeida por sempre se mostrar prestativa, por toda ajuda com os cálculos ao longo dos experimentos e por pegar minha atrazina kkkkk <3, à Larissa Costa por ter se disponibilizado em ir buscar minha atrazina no Pici, à Yasmin Girão por todos os momentos divertidos e à Ana Paula por sempre estar disposta a me ajudar.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Elizi Sena por toda ajuda, vidrarias lavadas e conversas descontraídas, Régia Leiliana por todo apoio, ajuda e momentos divertidos e Vitória Régia por toda ajuda, momentos divertidos, conversas aleatórias e por ter me feito esperar o maldito Taquara das “20:00” várias e várias vezes. Amo vocês <3.

Aos meus amigos Topzeiras, Lucas Peixoto por todos os momentos divertidos dentro e fora da universidade. Ao Roniiiiin por ser sempre tão divertido e tornar o ambiente acadêmico mais descontraído e, por último e não menos importante ao Sr Raul Vitor por toda fofura espalhada nos corredores do Labomar, pelos momentos agradáveis de laboratório e por todos os lanchos compartilhados. Sem vocês a experiência de quase morte não teria sido a mesma <3.

Aos meus amigos de turma, em especial ao Daniel Anzolin por ser um amigo sempre prestativo, generoso e de um coração gigantesco. À Sarah Barbosa por todos os momentos divertidos juntos e pela adorável experiência (só que não) em cálculo kkkk. À Sâmila Lima por sempre se mostrar uma grande amiga e estar presente nos momentos mais difíceis, por todo apoio e incentivo. Amo você <3. À Mariana Lima por ser uma amiga mais que divertida, por todos os lanchos compartilhados e por todo apoio <3. À Maria Clara (Marie), por ser uma grande amiga e um ser humano muito iluminado <3.

Aos amigos que fazem parte do “juntos e misturados”, Lucas Ricardo, por ser um ser humano lindo, gentil e de um coração gigantesco, por ser mais que um amigo, por todos os momentos juntos, por cada palavra de incentivo e por ter se tornado uma pessoa essencial na minha vida <3. Ao Rafael Santos, por ter se tornado um grande amigo, por sempre se mostrar tão prestativo e por toda ajuda e orientação. À Débora Carvalho, por ser uma amiga tão autêntica (estranha), com um coração enorme, generoso e sensível. À Vanessa Melo (pisadeira), por ser uma grande amiga, pelos momentos de descontração, por cada palavra de reclamação e por ser tão dramática.

À Maria Helena (Bey), por ser um dos melhores presentes que a universidade poderia ter me dado, por sempre se fazer presente e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da vida. Amo tu <3.

A todos os amigos que o curso de Ciências Ambientais me deu, em especial: Mayra Aguiar, Louise Melo, Brenda Rebouças, Adson Queiroz e Salete Exguia Pezão!!!

As minhas amigas de vida Ana Carolinna e Jéssyka Noronha, por todo incentivo e momentos agradáveis juntos ao longo da vida.

Ao professor Rivelino Cavalcante, por fornecer o agrotóxico utilizado.

A todos os servidores, técnicos-administrativos e terceirizados que integram o Instituto de Ciências do Mar, em especial a todos os professores que fizeram parte da minha vida acadêmica.

Por fim, agradeço aos colaboradores que me financiaram ao longo da graduação: CNPq, CAPES e UFC.

“Toda pessoa deveria ser aplaudida de pé pelo menos uma vez na vida, porque todos nós vencemos o mundo.”

R. J. Palacio.

RESUMO

A preocupação com a presença de agrotóxicos no ambiente é tão antiga quanto a introdução dessas substâncias no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. O uso de defensivos agrícolas no meio rural brasileiro vem trazendo uma série de consequências, tanto para o ambiente, quanto para a saúde do trabalhador rural. Estudos mostram que microrganismos expostos aos agrotóxicos são submetidos à pressão seletiva, desenvolvendo resistência a esses compostos e também a alguns antimicrobianos, em um fenômeno conhecido como “resistência cruzada”. O objetivo deste trabalho foi detectar *in vitro* o fenômeno de indução da expressão de resistência a antibióticos em bactérias após exposição a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e glifosato. Para tal, foi realizada exposição *in vitro* aos herbicidas e, após isso, realizado teste de antibiograma com exposição e sem exposição aos agrotóxicos. Os resultados mostraram que houve uma variação no perfil de resposta das bactérias após exposição aos herbicidas. Determinou-se antibióticos que apresentam a resistência cruzada com os agrotóxicos utilizados. Além disso, tanto a ação da atrazina, quanto do glifosato desencadearam um alto índice de resistência, principalmente aos antibióticos pertencentes ao grupo de inibição da síntese de parede celular: Ampicilina e Penicilina. O índice de múltipla resistência mostrou bactérias resistentes até três antibióticos diferentes.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Antibióticos. Resistência-cruzada.

ABSTRACT

The concern with the presence of pesticides in the environment is as old as the introduction of these substances in the control of pests and diseases that affect agricultural production. The use of agricultural defensives in the Brazilian countryside has brought a number of consequences, both for the environment and for the health of the rural worker. Studies show that microorganisms exposed to pesticides are subjected to a selective shock, developing resistance to some compounds and also some antimicrobials in a phenomenon known as "cross resistance". The aim of this work was to detect in vitro the phenomenon of induction of the expression of resistance to antibiotics in bacteria after exposure to different concentrations of the herbicides atrazine and glyphosate. For this purpose, it has been exposed in vitro to herbicides and subjected to an antibiogram test with exposure and without exposure to pesticides. The results showed a variation in the profile of response from exposure to herbicides. Certain antibiotics presented cross-resistance with the pesticides used. In addition, both the action of atrazine and glyphosate triggered a high resistance index, mainly to the antibiotics, components of the cell wall synthesis inhibition group: ampicillin and penicillin. The multiple resistance index showed bacteria resistant to up to three different antibiotics.

Keywords: Pesticides. Antibiotics. Cross-resistance.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Dinâmica dos agrotóxicos no ecossistema. | 26 |
| Figura 2 - Estrutura molecular da atrazina. | 27 |
| Figura 3 - Estrutura molecular do glifosato..... | 29 |
| Figura 4 - Mecanismos de ação dos antibióticos. | 31 |
| Figura 5 - Mecanismos de resistência bacteriana. | 33 |
| Figura 6 - Fluxograma da Técnica de Coloração de Gram. | 37 |
| Figura 7 - Fluxograma do teste de antibiograma. | 39 |
| Figura 8 - Fluxograma do teste de antibiograma com exposição aos agrotóxicos. | 42 |
| Figura 9 - Crescimento bacteriano com exposição aos agrotóxicos após o período de incubação..... | 42 |
| Figura 10 - Imagens dos resultados de antibiograma da cepa 120 antes e após exposição a concentrações do pesticida glifosato..... | 52 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Os sete agrotóxicos mais vendidos no Brasil entre os anos de 2013 e 2017..... | 24 |
| Gráfico 2 - Vendas por classes de uso dos produtos formulados em 2017. (tonelada por ingrediente ativo). | 25 |
| Gráfico 3 - Perfil de susceptibilidade bacteriana após exposição a atrazina. | 47 |
| Gráfico 4 - Perfil de susceptibilidade bacteriana após exposição ao glifosato..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Principais categorias de agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida e ao grupo químico a que pertencem..... | 23 |
| Tabela 2 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL50..... | 23 |
| Tabela 3 – Gêneros bacterianos utilizados neste trabalho com suas respectivas numerações. | 35 |
| Tabela 4 – Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição para Enterobacteriaceae e Staphylococcus spp..... | 40 |
| Tabela 5 – Discos dos antimicrobianos utilizados de acordo com os mecanismos de ação. ... | 40 |
| Tabela 6 – Características morfotintoriais. | 44 |
| Tabela 7 – Resultado do antibiograma sem exposição aos agrotóxicos. | 45 |
| Tabela 8 – Resultado do antibiograma com exposição à 50ppm de atrazina..... | 46 |
| Tabela 9 – Resultado do antibiograma com exposição à 100ppm de atrazina..... | 46 |
| Tabela 10 – Resultado do antibiograma com exposição à 50ppm de glifosato..... | 48 |
| Tabela 11 – Resultado do antibiograma com exposição à 100ppm de glifosato..... | 49 |
| Tabela 12 – Índice de múltipla resistência a antimicrobianos em extirpes bacterianas expostas a concentrações de atrazina e glifosato. | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| Amp | Ampicilina |
| AMPA | Ácido Aminometilfosfônico |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| Clo | Cloranfenicol |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EPA | Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos |
| EPSPS | 5- enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase |
| Gen | Gentamicina |
| I | Resistência Intermediária a antibiótico |
| IBAMA | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MMA | Ministério do Meio Ambiente |
| MRSA | Meticilina |
| MS | Ministério da Saúde |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBPs | Penicilinas |
| POEA | Polioxietileno Amine |
| R | Resistência a antibiótico |
| S | Suscetibilidade a antibiótico |
| SINDAG | Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola |
| TSA | Trypticase soy agar |
| TSB | Tryptic Soy Broth |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------------|--|
| % | Porcentagem |
| DL ₅₀ | Dose Média Letal |
| G | Gramma |
| mg/kg | Miligramas por quilo |
| PPM | Parte por milhão |
| UFC/ml | Unidades formadoras de colônia por mililitro |
| µg | Micrograma |
| U | Unidade |
| °C | Grau Celsius |
| L | Litro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 21 |
| 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO..... | 22 |
| 3.1 Agrotóxicos..... | 22 |
| 3.1.1 Consumo no Brasil..... | 23 |
| 3.1.2 Impactos..... | 25 |
| 3.2 Atrazina..... | 27 |
| 3.3 Glifosato..... | 28 |
| 3.4 Antimicrobianos e a resistência bacteriana..... | 30 |
| 3.5 Resistência cruzada..... | 33 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 4.1 Seleção dos microrganismos..... | 35 |
| 4.2 Reativação e purificação das estirpes..... | 36 |
| 4.2.1 Ágar soy trypticase (TSA, Difco)..... | 36 |
| 4.2.2 Caldo Tryptic Soy (TSB, Difco)..... | 36 |
| 4.2.3 Solução salina 0,85% e 1%..... | 36 |
| 4.2.4 Meios de cultura utilizados no antibiograma..... | 37 |
| 4.3 Comprovação da pureza das estirpes..... | 37 |
| 4.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos – antibiograma sem exposição aos agrotóxicos (método de difusão em discos, Teste de Kirby - Bauer)..... | 38 |
| 4.5 Exposição <i>in vitro</i> aos pesticidas – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (antibiograma)..... | 40 |
| 4.6 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos – antibiograma (após exposição à atrazina e glifosato)..... | 43 |
| 4.7 Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR)..... | 43 |
| 4.8 Identificação de cepas multirresistentes..... | 43 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 5.1 Pureza das estirpes..... | 44 |
| 5.2 Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos sem exposição aos agrotóxicos..... | 44 |
| 5.3 Suscetibilidade das estirpes bacterianas frente aos antimicrobianos após exposição à atrazina..... | 45 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.4 | Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos com exposição ao glifosato. | 48 |
| 5.5 | Índice de múltipla resistência a antimicrobianos..... | 51 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 53 |
| | REFERÊNCIAS..... | 54 |
| | APÊNDICE A..... | 64 |
| | APÊNDICE B..... | 65 |
| | APÊNDICE C..... | 66 |
| | APÊNDICE D..... | 69 |

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a presença de agrotóxicos no ambiente é tão antiga quanto a introdução dessas substâncias no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola. O desenvolvimento dos agrotóxicos foi impulsionado pelo anseio do homem em melhorar sua condição de vida, procurando aumentar a produção dos alimentos (BORSOI *et al.*, 2014). A partir da “Revolução Verde”, no início da década de 60, diversas modificações ocorreram no processo de produção agrícola. Tecnologias mais modernas foram adotadas, tendo como base o uso extensivo de agentes químicos visando o controle de pragas e insetos e, conseqüentemente, o aumento da produtividade (MOREIRA *et al.*, 2002).

Com o aumento do setor agrícola, o crescimento do consumo desses agentes químicos aumentou consideravelmente. Em 2008, de acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG, 2009), o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, em razão das vendas dessas substâncias somarem US\$ 7,1 bilhões diante de US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os norte-americanos (CASSAL *et al.*, 2014).

O uso de defensivos agrícolas no meio rural brasileiro vem trazendo uma série de conseqüências, tanto para o ambiente, quanto para a saúde do trabalhador rural. Quando utilizados na agricultura, seguem diferentes rotas no ambiente, existindo grandes chances de alcançarem o solo e as águas subterrâneas. Do total de agrotóxicos aplicados por pulverização, menos de 10% atingem seu alvo e, mesmo quando aplicados diretamente nas plantas, possuem como destino final o solo, em razão da lavagem das folhas por ação das chuvas ou águas de irrigação (ARAUJO, 2016).

No nordeste brasileiro, o agronegócio vem gerando impactos ambientais, onde a agricultura aparece como um dos principais fatores de poluição difusa de água e solos por fertilizantes e agrotóxicos (PINHEIRO; AMARAL; CARVALHO, 2010). No Ceará, a fruticultura irrigada vem se desenvolvendo e gerando grandes impactos. Estudo realizado na região do Baixo Jaguaribe mostrou que uma grande quantidade de agrotóxicos está sendo lançada na região do semiárido cearense, sendo a atrazina e o glifosato os princípios ativos mais frequentes nos produtos agrícolas utilizados na região (GAMA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2013).

Uma das grandes problemáticas inerentes a essas substâncias é o impacto sobre a microbiota dos ecossistemas. Estudos mostram que microrganismos expostos aos agrotóxicos são submetidos à pressão seletiva, desenvolvendo resistência a esses compostos e também a

alguns antimicrobianos, em um fenômeno conhecido como “resistência cruzada”. Figueiredo *et al.*, (2007) identificou resistência cruzada em bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* sp frente a múltiplos fármacos. Oliveira (2018) observou o mesmo fenômeno em bactérias Gram negativas pertencentes a diferentes sistemas de manejo agrícola do Ceará.

Um relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), listou alguns patógenos prioritários resistentes a antibióticos com o intuito de promover pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, já que a descoberta de novas opções de tratamento contra estes organismos vem diminuindo ao longo dos anos. Além da *Pseudomonas aeruginosa*, estão citadas no documento algumas bactérias da família Enterobacteriaceae incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp.

Em vista dos argumentos apresentados, o presente trabalho teve como objetivo detectar *in vitro* o fenômeno de indução da expressão de resistência a antibióticos em bactérias isoladas do estuário do Rio Jaguaribe após exposição a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e glifosato.

2. OBJETIVOS

Detectar *in vitro* o fenômeno de indução da expressão de resistência a antibióticos em bactérias após exposição a diferentes concentrações dos herbicidas atrazina e glifosato.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer perfis de suscetibilidade a antibióticos entre os isolados bacterianos;
- Detectar alterações de resposta aos antibióticos nos isolados bacterianos após exposição aos agrotóxicos;
- Determinar os perfis fenotípicos de resistência a antibióticos entre os isolados bacterianos através de teste de antibiograma.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos, praguicidas, defensivos agrícolas, pesticidas, agroquímicos, biocidas. Essas são algumas das diversas nomenclaturas dadas às substâncias ou misturas de substâncias naturais ou sintéticas utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas (UNIVERSIDADE DE CAXIAS, 2015).

No Brasil, conforme dispõe a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989 regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, os agrotóxicos podem ser definidos como:

os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

O Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, encarrega-se por estabelecer as competências para os três órgãos responsáveis pelo registro de agrotóxicos: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ministério da Saúde (MS) e Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (BRASIL, 2002).

Quanto à finalidade do uso, os agrotóxicos podem ser classificados pelo poder de ação do ingrediente ativo sobre organismos-alvo, como: fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, entre outros grupos (PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010). Dentre essas classes, as três principais, que correspondem cerca de 95% do consumo mundial de agrotóxicos entre 1960 e 2003 são os herbicidas (48%) inseticidas (25%) e fungicidas (22%) (VELASCO; CAPANEMA, 2006).

A Tabela 1 mostra as principais categorias de agrotóxicos de acordo com a natureza da praga combatida e o grupo químico a que pertencem incluindo os dois agrotóxicos alvos do estudo da classe dos herbicidas (Atrazina e Glifosato).

Tabela 1 – Principais categorias de agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida e ao grupo químico a que pertencem.

| Classificação quanto à natureza da praga controlada | Classificação quanto ao grupo químico | Exemplos (produto/substâncias/agentes) |
|--|--|---|
| Inseticidas (controle de insetos) | Inorgânicos | Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio |
| | Organoclorados | Aldrin,* DDT,* BHC* |
| | Organofosforados | Metil-paration |
| Fungicidas (combate aos fungos) | Inorgânicos | Calda Bordalesa, enxofre |
| | Ditiocarbamatos | Mancozeb, Tiram, Metiram |
| | Fentalamidas | Captam |
| Herbicidas (combate a plantas invasoras) | Triazina | Atrazina |
| | Glicina substituída | Glifosato |

* Proibido em vários países e no Brasil.

Fonte: adaptado de PERES; MOREIRA, (2003).

Os agrotóxicos também são classificados de acordo com sua toxicidade. Esta classificação é fundamental para o conhecimento do poder tóxico de um produto, do ponto de vista de seus efeitos agudos. No Brasil, o órgão responsável pela classificação toxicológica dessas substâncias é o MS (OPAS, 1997).

Segundo a Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992 do MS, os agrotóxicos podem ser classificados como: Classe I-Extremamente tóxico, Classe II-Altamente tóxico, Classe III-Moderadamente tóxico e Classe IV-Pouco tóxico (BRASIL, 1992) (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL50.

| Classe toxicológica | Toxicidade | DL₅₀ (mg/kg) | Faixa colorida |
|----------------------------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|
| I | Extremamente tóxico | ≤ 5 mg/kg | Vermelha |
| II | Altamente tóxico | Entre 5 e 50 mg/kg | Amarela |
| III | Medianamente tóxico | Entre 50 e 500 mg/kg | Azul |
| IV | Pouco tóxico | Entre 500 e 5.000 mg/kg | Verde |
| - | Muito pouco tóxico | Acima de 5.000 mg/kg | - |

Fonte: adaptado de PERES; MOREIRA, (2003).

3.1.1 Consumo no Brasil

Apesar da agricultura ser praticada pela humanidade há milhares de anos, o uso intensivo de substâncias para o controle de pragas e doenças existe desde o século passado,

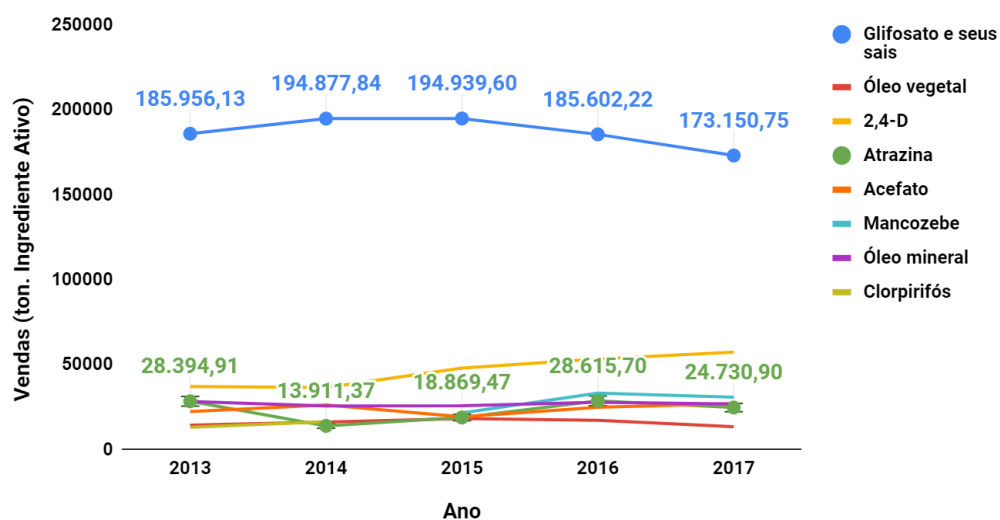
tendo início após as grandes guerras mundiais, quando as indústrias responsáveis pela fabricação de venenos, até então usados como armas químicas, encontraram na agricultura um novo mercado para seus produtos (LONDRES, 2011).

Diversas políticas foram implementadas em todo o mundo para expandir e assegurar este mercado. A partir da década de 1960, os governos brasileiros adotaram a política agrícola de modernização no campo denominada revolução verde, esta baseava-se na monocultura e no uso intensivo dos agrotóxicos, que tinha como incentivo as isenções fiscais cedidas às indústrias químicas (BRASIL, 2016).

No entanto, foi na última década que o mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu, assumindo proporções assustadoras. Entre 2001 e 2008, a venda de venenos agrícolas no país saltou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões, apresentando um crescimento de 190% em um ritmo maior que o dobro quando comparado com o mercado global com 93%, o que coloca o Brasil como maior consumidor mundial de agrotóxicos, desde 2008, ultrapassando os Estados Unidos (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

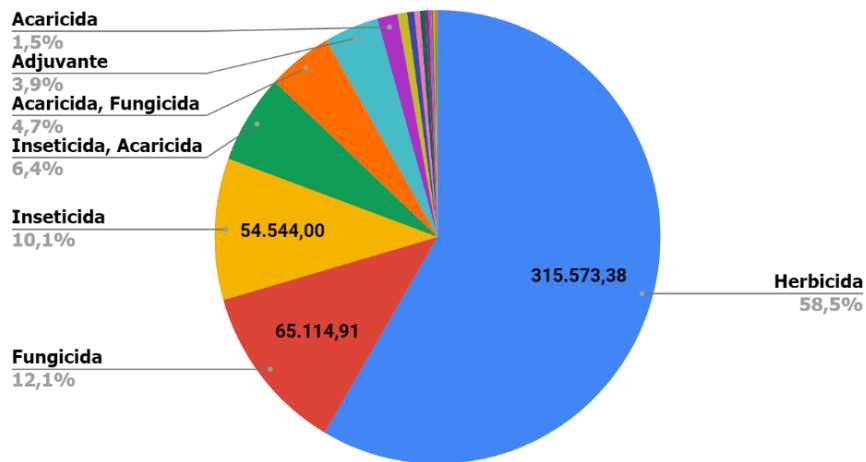
O Gráfico 1 apresenta os 7 agrotóxicos mais vendidos no Brasil entre os anos de 2013 e 2017 segundo o IBAMA, destacando os dois utilizados no presente trabalho, e o Gráfico 2 ilustra as vendas por classes de uso em 2017.

Gráfico 1 - Os sete agrotóxicos mais vendidos no Brasil entre os anos de 2013 e 2017.



Fonte: adaptado de IBAMA, (2019)

Gráfico 2 - Vendas por classes de uso dos produtos formulados em 2017. (tonelada por ingrediente ativo).



Fonte: adaptado de IBAMA, (2019).

De acordo com o Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos de 2016, o Ceará é o estado brasileiro com o terceiro maior consumo de agrotóxicos por área plantada (kg/ha), com 19,76 kg de produto aplicado em cada hectare plantado, ficando atrás somente do Rio de Janeiro (135,45 kg/ha) e São Paulo (35,72 kg/ha). Entretanto, apesar de o Estado aparecer proporcionalmente entre os maiores consumidores, em termos absolutos o Ceará não está entre os dez estados com maior consumo (CARNEIRO, 2015).

A dose recomendada desses herbicidas varia de acordo com o tipo de solo e cultura a ser controlada. De acordo com a Embrapa (2006), a atrazina, por exemplo, é indicada nas doses de 1,5 a 4 kg i.a. ha⁻¹, dependendo do tipo de solo: em solos leves, deve-se usar a menor dose, e em solos argilosos e com elevado nível de matéria orgânica, a maior dose.

3.1.2 Impactos

Um dos principais impactos representados pelos agrotóxicos diz respeito aos seus efeitos na saúde das pessoas, ainda mais daquelas que ficam sujeitas ao contato direto com eles, seja na indústria ou no campo. Existem diversos relatos de pessoas que passaram a ter sérias doenças, como câncer, provocadas pela exposição aos agrotóxicos, sendo que muitas delas deixam sequelas graves ou são fatais (UNIVERSIDADE DE CAXIAS, 2015).

De acordo com dados publicados pelo MS, 7.676 intoxicações relacionadas a agrotóxicos ocorreram no ano de 2010 no Brasil, sendo que 5.463 foram por uso agrícola e 2.213 uso doméstico, sendo que 64.49% desses casos ocorreram em áreas urbanas (SINITOX, 2010). Levando em conta que cerca de 85% da massa dos agrotóxicos é utilizada em atividades agrícolas, é inesperado que existam mais intoxicados no meio urbano do que no meio rural (OLIVEIRA-SILVA; MEYER, 2003).

Outro problema relacionado ao uso de agrotóxicos é o seu grande impacto ambiental. Os agrotóxicos, ao entrarem em contato com o meio ambiente, ficam sujeitos a diversos processos físico-químicos, que são reguladores do destino que essas substâncias terão. São eles: retenção, lixiviação, escoamento superficial, volatilização, absorção pelas plantas, fotodegradação, decomposição química e microbiológica, conforme mostra a Figura 1 (BAILEY; WHITE, 1970).

Figura 1 - Dinâmica dos agrotóxicos no ecossistema.



Fonte: elaborado pelo autor.

Um dos efeitos ambientais indesejáveis é a infertilidade e contaminação dos solos e águas superficiais e subterrâneas. A contaminação desses recursos naturais é um grande problema, uma vez que essas regiões atuam como via para o transporte dessas substâncias para fora das áreas fonte. Se regiões agrícolas estiverem localizadas próximas a mananciais hídricos responsáveis por fornecer água para uma cidade, a qualidade dessa água estará seriamente sob o risco de uma contaminação. Ademais, espécies não-alvo, ou seja, que não interferem no

processo de produção que se tenta controlar, onde se inclui a espécie humana, também acabam sendo comprometidas (PERES; MOREIRA, 2003).

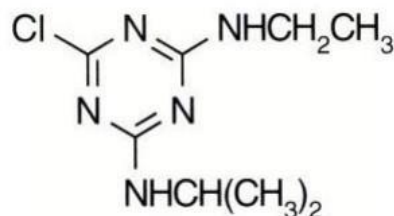
No Estado do Ceará, mais especificamente na região da Chapada do Apodi, a contaminação das águas subterrâneas por agrotóxicos tem aumentado em razão de atividades como a pulverização aérea, que apresenta riscos à saúde, uma vez que essa prática ocorre próximo às comunidades. Além disso, os agrotóxicos utilizados são bastante perigosos, em razão de serem classificados, em sua maioria, como extremamente ou muito tóxicos e serem persistentes no ambiente (PONTES *et al.*, 2013).

Uma das possíveis soluções para diminuir o efeito desses agrotóxicos no ambiente seria o uso de biopesticidas. Segundo a United States Environmental Protection Agency (EPA, 2019), o termo se refere a produtos feitos a partir de microrganismos, substâncias naturais ou derivados de plantas geneticamente modificadas, que façam controle de pestes.

3.2 Atrazina

A atrazina é um herbicida pertencente a classe química das triazinas (Tabela 1) correspondendo cerca de 30% dos herbicidas usados no mundo (CABRAL *et al.*, 2003), classificada como moderadamente tóxica - classe III (Tabela 2), sendo de uso intensivo no controle de ervas daninhas. Sua estrutura química (Figura 2) é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, tornando-a recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (COLLA *et al.*, 2008). Seu emprego anual no mundo é estimado em 111.000 toneladas, onde é aplicada frequentemente em combinação com outros herbicidas (SENE, 2010).

Figura 2 - Estrutura molecular da atrazina.



Fonte: ANVISA, (2016).

A atrazina é comumente encontrada no monitoramento de solos e águas subterrâneas e superficiais devido ao seu uso intenso, baixa solubilidade e reatividade. Em contato com um ecossistema aquático ou terrestre, pode causar impacto a comunidades como

crustáceos, peixes, anfíbios e répteis (COUTINHO *et al.*, 2005). Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados nessas regiões após muito tempo de aplicação (MELI *et al.*, 1992), uma vez que seu tempo de vida médio possui uma variação de 20 até mais de 100 dias, sendo que, em regiões tropicais e subtropicais, podem permanecer por mais de 1 ano em razão da dose aplicada.

De acordo com Benvenuto *et al.* (2010), compostos triazínicos foram identificados em amostras de rios de regiões da Itália e Espanha e observaram a presença da atrazina em sete de onze rios estudados das regiões de Valência e Milão. A atrazina já foi encontrada em águas subterrâneas, em uma frequência maior que o segundo contaminante da lista de ocorrências catalogadas nos Estados Unidos (HALLBERG, 1989).

No Ceará, foram encontradas concentrações de atrazina em águas subterrâneas com níveis que chegaram a $42,77\mu\text{gL}^{-1}$ no município de Tianguá (BARRETO; NASCIMENTO, 2004). Na região do perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi, foi detectada atrazina em 36 poços monitorados em concentrações menores e maiores que o limite máximo permitido pela resolução CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005, que estabelece um valor de $2,0\mu\text{gL}^{-1}$ (BARRETO, 2006).

Um estudo realizado na região da bacia do rio Jaguaribe com o objetivo de avaliar o potencial de mobilidade e destino de cinco agrotóxicos, constatou que a atrazina e o carbofuran foram os agrotóxicos que apresentaram maior mobilidade no ambiente e, conseqüentemente, possuem grande probabilidade de alcançarem e contaminarem os recursos hídricos (MONTEIRO; FONTENELE; CAVALCANTE, 2011).

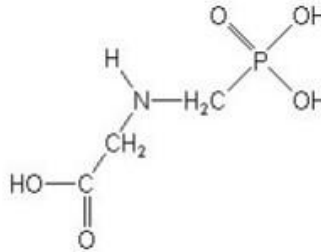
O uso desse herbicida também tem relação ao aumento de doenças nos seres humanos, a Agência Nacional dos Estados Unidos (EPA) (2006) considera essa substância potencialmente carcinogênica, uma vez que atua como um disruptor endócrino (GRAYMORE *et al.*, 2001; GHISELLI; JARDIM, 2007; MARECICK *et al.*, 2008). Além disso, também é prejudicial para as mulheres gestantes, por causar anomalias pré-natais, gerando bebês prematuros e/ou abortos espontâneos (HASE *et al.*, 2008; CHEVRIER *et al.*, 2011; CRAGIN *et al.*, 2011; RAJKOVIC *et al.*, 2012; MIGEOT *et al.*, 2013).

3.3 Glifosato

O glifosato, cuja estrutura molecular está presente na Figura 3, foi originalmente sintetizado em 1964 como potencial quelante industrial e seu uso como herbicida foi descrito apenas em 1971 (AMARANTE JUNIOR; SANTOS; BRITO, 2002). É um herbicida pós-

emergente pertencente à classe química das glicinas substituídas, classificado como pouco tóxico – classe IV, sendo não seletivo e de ação sistêmica, apresentando um largo espectro de ação que possibilita um ótimo controle de plantas daninhas sazonais ou perenes, além de agir como um potente inibidor da atividade da 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), sendo esta responsável por catalisar uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Figura 3 - Estrutura molecular do glifosato.



Fonte: ANVISA, (2016).

A partir da implementação dos transgênicos, resistentes a herbicidas, o glifosato passou a ser um produto imprescindível à agricultura, de modo que seu consumo aumentou significativamente (CUNHA, 2005). A principal via de biodegradação do glifosato compreende a clivagem da molécula, produzindo como metabólito o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (LIU, 1991). Tanto o glifosato quanto o AMPA possuem alta solubilidade em água, podendo entrar em ambientes aquáticos, quando usado diretamente como herbicida para o controle de plantas aquáticas e banco de invasoras ou pelo escoamento superficial de áreas em que foi aplicado (MOGADATI *et al.*, 1996).

O glifosato apresenta persistência variável no ambiente, apesar de ser degradado pelos microrganismos (NEWTON *et al.*, 1994). Sua adsorção ao solo e disponibilidade para biodegradação são alguns dos fatores que estão relacionados com a sua persistência ambiental. Os estudos sobre a dispersão do herbicida no solo têm sido realizados com o intuito de entender a relação entre a atividade microbiana e sua função na dinâmica deste composto (ARAÚJO, 2002).

A meia-vida do glifosato no solo pode alternar de menos de uma semana até alguns meses, em razão dos teores de argila e matéria orgânica, bem como o nível de atividade microbiana (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). Um estudo realizado sobre o uso de glifosato em solo com e sem histórico de contaminação por esse herbicida mostrou que houve um aumento na população bacteriana e a degradação desse agrotóxico se tornou mais rápida no

solo contaminado, enquanto no solo sem contaminação houve redução da comunidade bacteriana (ARAÚJO; MONTEIRO; ABARKELI, 2003).

Em plantas terrestres e aquáticas, um dos efeitos do glifosato é a inibição do processo de fotossíntese. No mercado são encontradas formulações que possuem não só o glifosato em suas composições, pode-se encontrar surfactantes, como o chamado polioxietileno amine (POEA), que é uma provável causa da toxicidade aquática das formulações à base de glifosato (TSUI; WANG; CHU, 2005).

Nos Estados Unidos, O uso de glifosato teve um crescimento de menos de 5.000 para mais de 80.000 toneladas métricas / ano entre 1987 e 2007. De acordo com Battaglin *et al.*, (2014) o glifosato e o AMPA são geralmente detectados juntos, sendo móveis e ocorrendo amplamente no solo, águas de superfície e águas subterrâneas. No Ceará, o glifosato foi o agrotóxico mais frequentemente detectado na região do Rio Jaguaribe, advindo das atividades agrícolas, embora, com valores abaixo do limite de quantificação (GAMA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2013).

3.4 Antimicrobianos e a resistência bacteriana

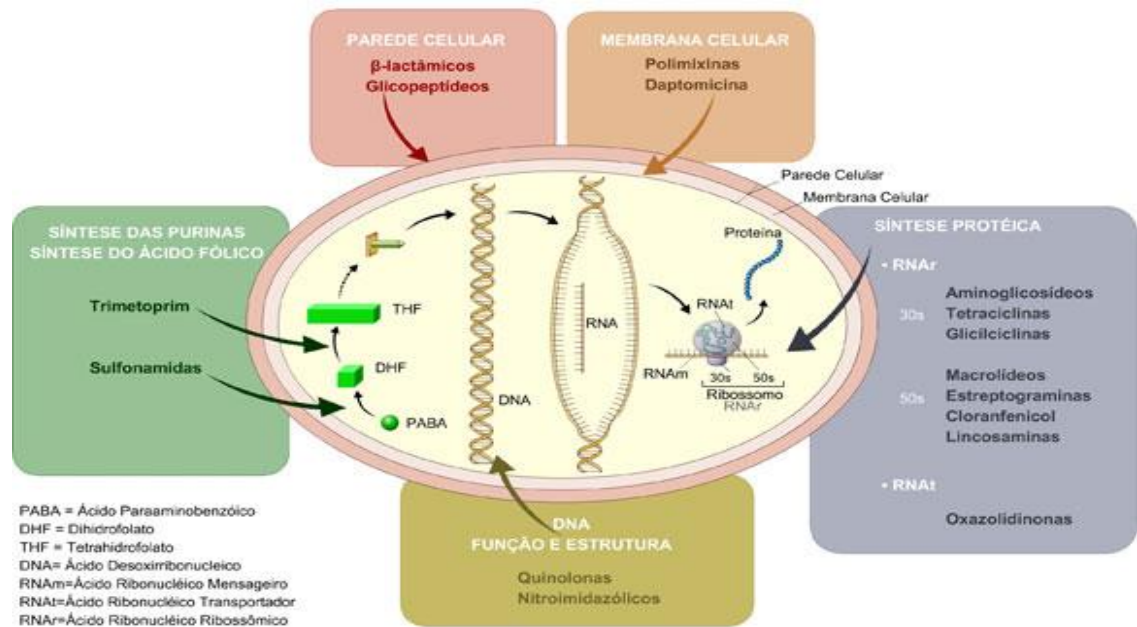
Inicialmente, os antibióticos foram definidos como substâncias químicas sintetizadas por diversas espécies de microrganismos, animais e vegetais, que dificultam o crescimento de outros. A descoberta dos antibióticos e quimioterápicos possibilitou o controle e cura de várias doenças infecciosas, modificando a evolução natural dessas doenças (MOREIRA, 2004). Acontecimento este que teve início com a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, considerado um dos eventos mais importantes da história da ciência do século XX (PEREIRA; PITA, 2005).

Os antimicrobianos podem ser definidos como substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos, de modo a inibir o seu crescimento ou causar a sua destruição (SÁEZ-LLORENS *et al.*, 2000). Os antibióticos fazem parte das classes de medicamentos mais utilizadas, tanto para uso intra-hospitalar quanto para a automedicação, sendo classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos quando inibem o crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Os antibióticos se diferem uns dos outros quanto às propriedades químicas e seus espectros, classificam-se quimicamente como: derivados de aminoácidos, de açúcares, de acetatos, propionatos, entre outros. Ademais, podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese ou dano da

membrana citoplasmática, inibição da síntese proteica nos ribossomas, alterações na síntese dos ácidos nucleicos e alteração de metabolismos celulares (TAVARES, 2014). Tal como representado na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismos de ação dos antibióticos.



Fonte: ANVISA, (2007a).

Segundo Gottesman e colaboradores (2009), a relação entre o uso de antimicrobianos e o progresso da resistência bacteriana é conhecida desde a inserção da penicilina, tendo sido, a partir de então, sistemicamente confirmada após o lançamento de vários representantes de cada uma das diferentes classes farmacológicas e do conhecimento de seus mecanismos de ação.

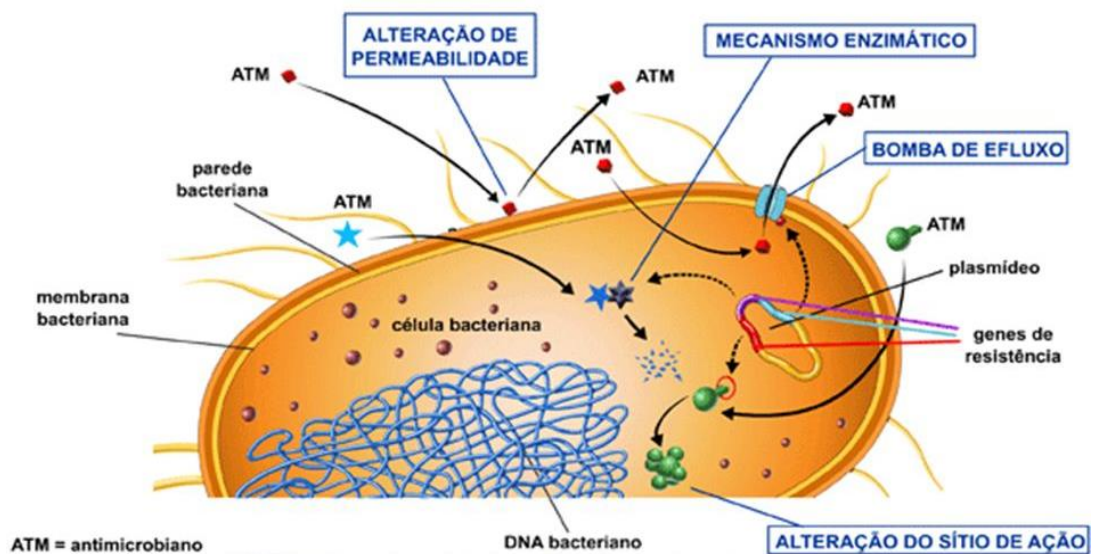
O uso em excesso de antibióticos dentro dos hospitais, bem como o uso pela população sem a prescrição e acompanhamento de um médico, além da interrupção do tratamento antes do tempo prescrito pode acelerar o surgimento de resistência bacteriana. Por volta da década de 1950, foram registrados os primeiros surtos por *Staphylococcus aureus* com resistência a penicilina em ambiente hospitalar, fato consolidado quando, em meados de 1960, surgiu o primeiro caso de resistência às recém descobertas penicilinas β-lactâmicas, como a meticilina (MRSA), constatando-se, então, no final da década de 1970, as cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à MRSA como uma pandemia (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ocorrer de forma intrínseca do microrganismo, que ocorre sem necessariamente existir uma exposição prévia ao antibiótico,

conhecido como resistência natural, ou adquiridos por transmissão/aquisição de material genético presente em outro microrganismo, denominada de transferência horizontal de genes, ou por mutação (RICE; BONOMO, 2005). A transferência horizontal de genes se dá pelos seguintes mecanismos: transformação, transdução, conjugação e transposição (BAPTISTA, 2013). Já, segundo a Anvisa (2007), a resistência adquirida (Figura 5) pode ser expressa das seguintes formas:

- Por meio de alterações na permeabilidade da membrana celular: Nas bactérias Gram negativas a permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo. A permeabilidade dessa membrana se encontra na presença das porinas, que são proteínas especiais responsáveis por estabelecer canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula;
- Alteração do sítio de ação do antimicrobiano: As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original, como a estrutura da parede de peptidoglicano ou a síntese de proteínas e DNA. Atua como mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos e glicopeptídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, oxazolidinonas, lincosamida e estreptogramina B;
- Bombas de efluxo: O bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. A resistência às tetraciclina codificada por plasmídeos em *Escherichia coli* resulta deste efluxo ativo.
- Mecanismo enzimático: Algumas bactérias são responsáveis pela degradação do antimicrobiano por enzimas. As β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo, assim, o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às proteínas de ligação as penicilinas (PBPs) bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano.

Figura 5 - Mecanismos de resistência bacteriana.



Fonte: ANVISA, (2007b)

3.5 Resistência cruzada

A resistência cruzada pode ser definida como a resistência aumentada a dois ou mais antimicrobianos dentro da mesma classe (KOBAYASHI, 2011). De acordo com Rangasamy e colaboradores (2017), uma bactéria ao desenvolver resistência a um pesticida por meio de mutações genéticas pode possibilitar que ela também seja resistente a diversos antibióticos, esta nova resistência é conhecida como resistência cruzada pesticida-antibiótico.

Segundo Oliveira (2018), as bactérias utilizam várias estratégias comuns, tanto contra pesticidas quanto antibióticos, para resistirem aos xenobióticos. Isso se manifesta de diversas formas, tais como: formação de biofilmes, criação de sítios ativos análogos a pesticidas e antibióticos, aumento no número de cópias dos genes essenciais para tolerância ao estresse, obtenção de genes de resistência a antibióticos juntamente com genes de resistência a agrotóxicos por transferência horizontal por intermédio de transposons, entre outros.

A resistência cruzada bactéria-antibióticos representa um importante campo de estudo e pode implicar significativo risco à saúde humana. Guimarães, Momesso e Pupo (2010) e Duarte *et al.*, (2009) destacam medidas para evitar a resistência bacteriana, como o uso racional dos antibióticos, prevenção de infecções bacterianas, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, bem como a busca por novos metabólitos ativos contra diferentes microrganismos patogênicos.

A resistência cruzada pesticida-antibiótico representa um grande problema ambiental, uma vez que as bactérias mais susceptíveis serão eliminadas e um pequeno grupo poderá sobreviver e proliferar, formando assim uma nova colônia de bactérias resistentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados nos experimentos pertencem ao acervo de bactérias da coleção de culturas microbianas Prof.^a Regine Vieira do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR - UFC). Os microrganismos são oriundos de amostras de água e sedimento de regiões doces e salinas dos municípios de Fortim, Itaiçaba e Jaguaruana ao longo do estuário do Rio Jaguaribe (MARTINS, 2015).

No total foram utilizados 12 microrganismos da bacterioteca, sendo 5 microrganismos Gram-negativos e 5 microrganismos Gram-positivos (Tabela 3), de modo que duas estirpes padrão foram usadas como controle, *Escherichia coli* ATCC 25922 para controle negativo e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para controle positivo. A escolha das estirpes ocorreu de uma maneira que se tivesse uma mesma quantidade de cada grupo para analisar a influência da parede de cada bactéria no perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos.

Os 10 isolados testados pertencem aos gêneros *Bacillus* sp, *Corynebacterium* sp, *Serratia* sp, *Tatumella* sp e *Vibrio* sp (Tabela 3).

Tabela 3 – Gêneros bacterianos utilizados neste trabalho com suas respectivas numerações.

| Código da bactéria | Gênero | Origem ambiental |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 51 Lamap | <i>Bacillus</i> sp | Sedimento (água doce) |
| 70 Lamap | <i>Serratia</i> sp | Sedimento (água salina) |
| 80 Lamap | <i>Bacillus</i> sp | Água salina |
| 93 Lamap | <i>Tatumella</i> sp | Água doce |
| 95 Lamap | <i>Tatumella</i> sp | Água doce |
| 98 Lamap | <i>Corynebacterium</i> sp | Sedimento (água doce) |
| 104 Lamap | <i>Corynebacterium</i> sp | Sedimento (água doce) |
| 109 Lamap | <i>Vibrio</i> sp | Água salina |
| 120 Lamap | <i>Corynebacterium</i> sp | Sedimento (água salina) |
| 124 Lamap | <i>Vibrio</i> sp | Água Salina |

Fonte: elaborado pelo autor

4.2 Reativação e purificação das estirpes

Para a reativação e comprovação da pureza das estirpes, foram esterilizados os meios com 1% de NaCl para as bactérias procedentes de água salgada e solução salina 0,85% de NaCl para aquelas de água doce.

As soluções, meios de cultura e vidrarias foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e tiveram seus pHs ajustados com solução de NaOH ou HCl 10%.

4.2.1 Ágar soy trypticase (TSA - Difco)

Este meio foi utilizado para estocagem das cepas isoladas. 10,8 g de meio TSA foram pesados e diluídos em 50 mL de água destilada para uma quantidade de 10 tubos de ensaio e 10,8 g de meio TSA pesados em 10 mL de água destilada com adição de 0,5 g de NaCl para 2 tubos de ensaio.

4.2.2 Caldo Tryptic Soy (TSB - Difco)

Este meio foi utilizado para o crescimento, com adição de atrazina e glifosato, das cepas isoladas. 16,8 g de meio foram pesados e diluídos em 560 mL de água destilada e 1,5 g de meio foram pesados e diluídos em 50 mL de água destilada com adição de 0,5 g de NaCl para caldo a 1%.

4.2.3 Solução salina 0,85% e 1%

Esta solução foi utilizada para realizar a diluição seriada. Foram pesados 0,76 g de NaCl e dissolvidos em 90 mL de água destilada para solução salina 0,85% e 0,18 g de NaCl dissolvidos em 18 mL de água destilada para solução salina 1%. 12 tubos de ensaio foram preenchidos com 9 mL da solução obtida e levados para esterilização, sendo armazenados até o dia da diluição.

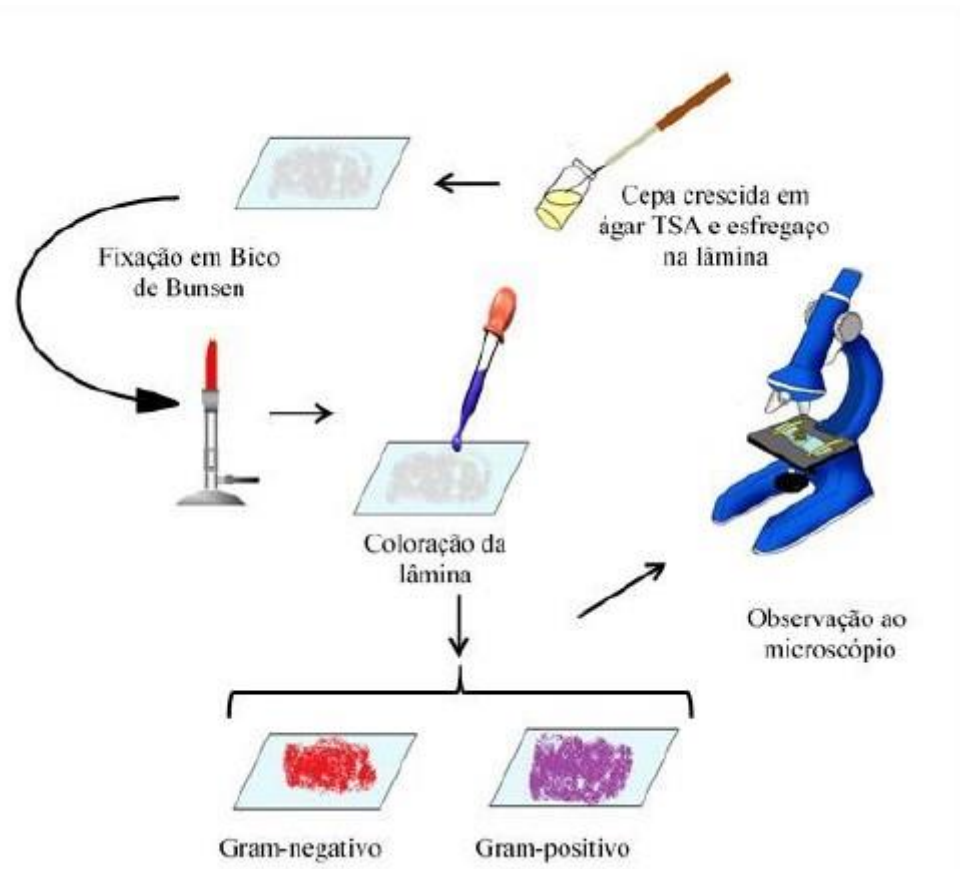
4.2.4 Meios de cultura utilizados no antibiograma

Para realização do teste de antibiograma, foi utilizado 38 g de *Ágar Mueller-Hinton* Difco para 1 L de água destilada, ágar TSA e TSA 1% de NaCl em uma proporção de 40 g por litro de água destilada e solução salina a 0,85% e 1% para ajuste do inóculo.

4.3 Comprovação da pureza das estirpes

Para comprovação da pureza e caracterização morfológica das estirpes isoladas, foi semeado material em ágar TSA para as bactérias provenientes de água doce e ágar TSA 1% de NaCl para as bactérias de água salgada e após o período de 24 horas de incubação, em estufa a 35°C, utilizou-se a técnica de coloração de Gram, que permite a classificação das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas ou Gram negativas, baseado em sua reação aos corantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma da Técnica de Coloração de Gram.



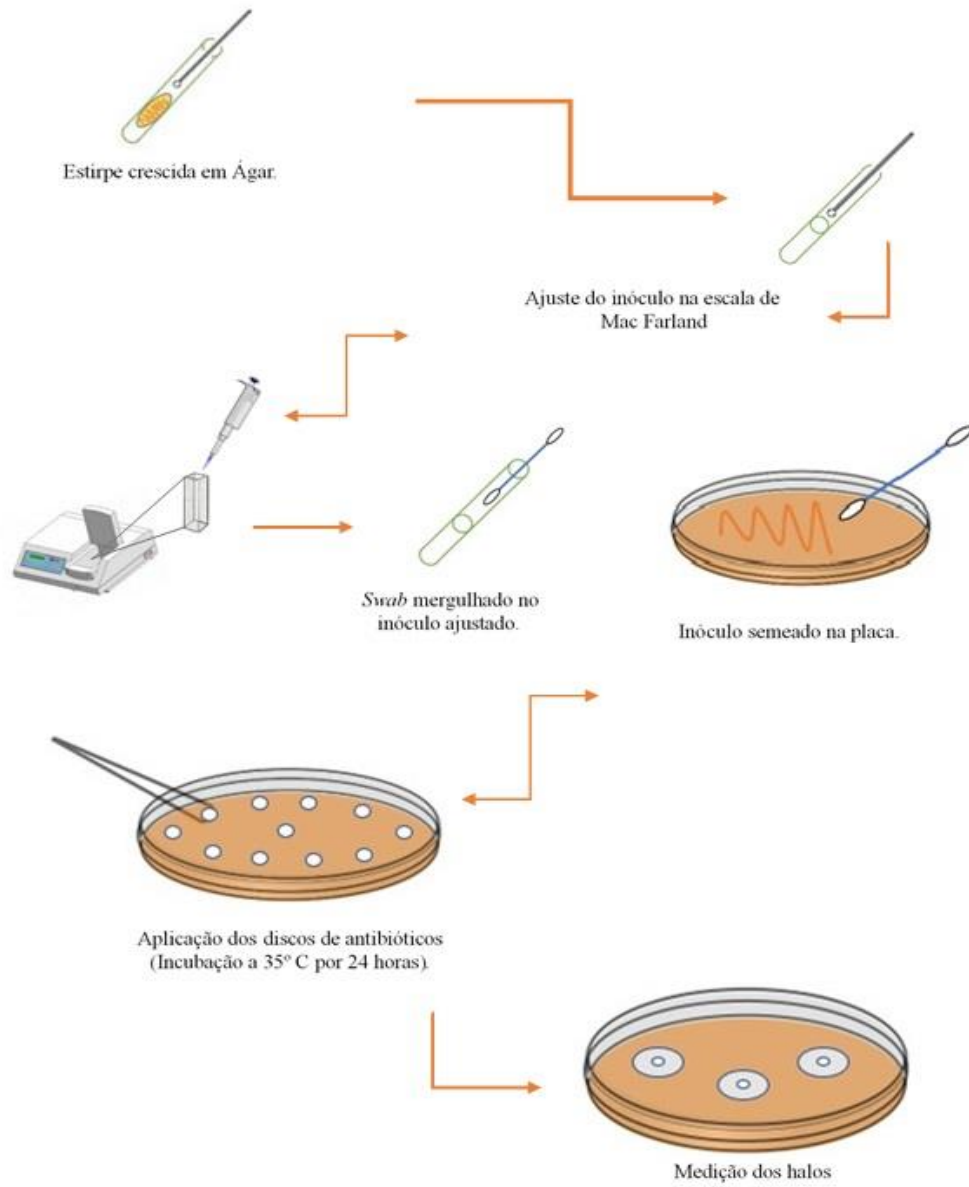
Fonte: SANTOS, (2013).

4.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos – antibiograma sem exposição aos agrotóxicos (método de difusão em discos, Teste de Kirby - Bauer)

Uma vez purificadas, as estirpes foram crescidas em ágar TSA Difco e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Após incubação, foi retirado material de colônia crescida e transferido para tubos contendo 9 mL de solução salina 0,85% e solução salina 1%, respectivamente, segundo exigência da bactéria. O conteúdo foi homogeneizado com ajuda de um agitador do tipo vórtex para a padronização de densidade de cada inóculo, de modo a se obter aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A absorvância de cada inóculo foi conferida em um espectrofotômetro (Micronal B542) com comprimento de onda de 625 nm.

Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril, as culturas foram semeadas sobre toda a superfície das placas de Petri contendo Ágar *Muller-Hinton* e *Muller-Hinton* 1%. Os discos de antimicrobianos foram aplicados no meio com a ajuda de uma pinça estéril (figura 7). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Após esse período, o diâmetro dos halos de inibição foi medido com a ajuda de um paquímetro digital e classificados em resistentes (R), Intermediárias (I) e Sensíveis (S) (Tabela 4), segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016).

Figura 7 - Fluxograma do teste de antibiograma.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição para Enterobacteriaceae e *Staphylococcus* spp.

| Antibiótico | Diâmetros dos halos de inibição (mm) | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|---------|------|---------------------------|---------|------|
| | Enterobacteriaceae | | | <i>Staphylococcus</i> spp | | |
| | R | I | S | R | I | S |
| Ácido Nalidíxico* | ≤ 13 | 14 - 18 | ≥ 19 | ≤ 10 | 11 - 15 | 16 ≥ |
| Ampicilina | ≤ 13 | 14 - 18 | ≥ 17 | ≤ 28 | - | 29 ≥ |
| Cloranfenicol | ≤ 12 | 13 - 17 | ≥ 18 | ≤ 12 | 13 - 17 | ≥ 18 |
| Gentamicina | ≤ 12 | 13 - 14 | ≥ 15 | ≤ 12 | 13 - 14 | ≥ 15 |
| Penicilina** | ≤ 26 | 27 - 46 | ≥ 47 | ≤ 28 | - | ≥ 29 |
| Sulfazotrim | ≤ 10 | 11 - 15 | ≥ 16 | ≤ 10 | 11 - 15 | ≥ 16 |

* Para Ácido Nalidíxico usou-se o parâmetro de Sulfazotrim, em razão de terem o mesmo mecanismo de ação, uma vez que não há teste deste antibiótico para *Staphylococcus* spp **Para penicilina usou-se o parâmetro de *Neisseria*, devido não haver teste deste antibiótico para *Staphylococcus* spp. Fonte: elaborado pelo autor.

As estirpes foram testadas frente a seis antimicrobianos pertencentes a três grupos que possuem diferentes mecanismos de ação, sendo eles: Grupo I: Inibidores da síntese de parede celular (Penicilina 10 U.I e Ampicilina 10 µg); Grupo II: Inibidores da síntese de proteína (Cloranfenicol 30 µg e Gentamicina 10 µg) e Grupo III: Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Sulfazotrim 25 µg e Ácido Nalidíxico 30 µg) (Tabela 5).

Tabela 5 – Discos dos antimicrobianos utilizados de acordo com os mecanismos de ação.

| Mecanismos de ação | Antimicrobianos | Concentração dos discos |
|--|------------------|-------------------------|
| Grupo I – Inibidores da síntese de parede celular | Ampicilina | 10 µg |
| | Penicilina | 10 U.I |
| Grupo II- Inibidores da síntese de proteínas | Cloranfenicol | 30 µg |
| | Gentamicina | 10 µg |
| Grupo III- Inibidores da síntese de ácidos nucleicos | Ácido Nalidíxico | 30 µg |
| | Sulfazotrim | 25 µg |

Fonte: elaborado pelo autor

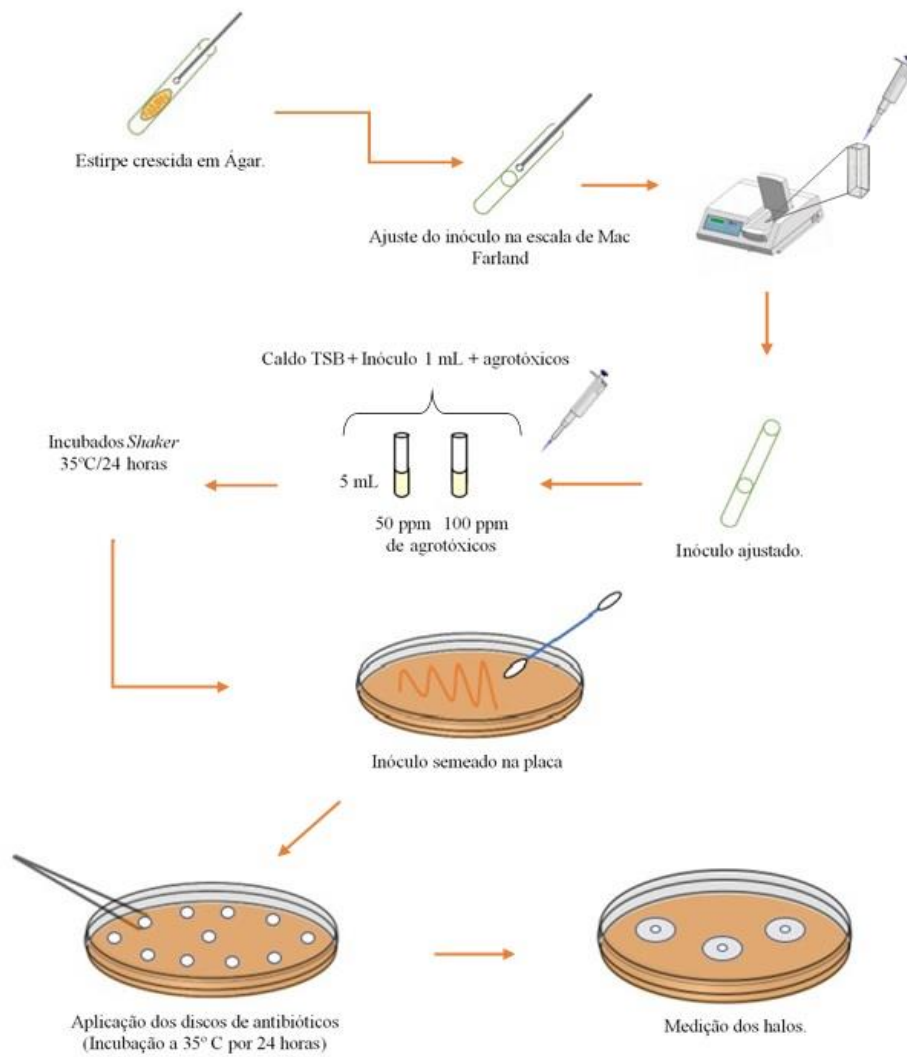
4.5 Exposição *in vitro* aos pesticidas – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

Para a exposição *in vitro* frente aos pesticidas, as estirpes, após serem isoladas em ágar TSA, foram incubadas novamente em estufa a 35°C por 24 horas. Após esse período, foi retirado material de colônia crescida e transferido para tubos contendo 9 mL de solução salina

0,85% e solução salina 1%. O conteúdo foi homogeneizado com ajuda de um agitador do tipo vórtex para a padronização de densidade de cada inóculo, de modo a se obter aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL como no item 4.4.

Por seguinte, com a ajuda de uma micropipeta LabMate, foram adicionados em tubos de ensaio previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, 1mL do inóculo, 50ppm e 100ppm de atrazina e glifosato previamente filtrados em filtro de seringa (0,22 μm x 30 mm, PES; Kasvi) e caldo TSB formando uma solução com 5mL (Figura 8). Em seguida, os tubos foram levados a uma incubadora *Shaker* a 35° C por um período de 24 horas. Após o período de incubação, o resultado de crescimento bacteriano com exposição aos herbicidas foi indicado pela presença ou ausência de turbidez no meio (Figura 9).

Figura 8 - Fluxograma do teste de antibiograma com exposição aos agrotóxicos.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 9 - Crescimento bacteriano com exposição aos agrotóxicos após o período de incubação.



Fonte: acervo do autor

4.6 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos – antibiograma (após exposição à atrazina e glifosato)

Após exposição, as estirpes foram novamente submetidas ao procedimento do antibiograma (item 4.4) com adição de solução em concentrações de 50ppm e 100ppm de atrazina e glifosato previamente filtradas em filtro de seringa (0,22 µm x 30 mm, PES; Kasvi) como no item 4.5, com o intuito de observar o perfil de resposta frente aos antimicrobianos após serem expostas aos herbicidas.

4.7 Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR)

Os resultados do antibiograma foram utilizados para obtenção do índice de resistência múltipla (MAR). Para isso, calculou-se o número de antimicrobianos ao qual determinado microrganismo foi resistente sobre o número total de antibióticos testados (KRUMPERMAN, 1983).

$$\text{MAR} = a/b \quad (1)$$

Onde a = número de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente

b = número de antimicrobianos aos quais os isolados foram expostos.

4.8 Identificação de cepas multirresistentes

A identificação de cepas multirresistentes se deu conforme a definição proposta por Magiorakos e colaboradores (2012), que define uma bactéria multirresistente como sendo aquela resistente a pelo menos um agente dentro de três ou mais categorias de antibióticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pureza das estirpes

A Tabela 6 mostra as características morfotintoriais de cada isolado bacteriano.

Tabela 6 – Características morfotintoriais.

| Cepa | Coloração de Gram | Morfologia |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------|
| 51 <i>Bacillus</i> sp | Positiva + | Bastonetes |
| 70 <i>Serratia</i> sp | Negativa - | Bastonetes |
| 80 <i>Bacillus</i> sp | Positiva + | Bastonetes |
| 93 <i>Tatumella</i> sp | Negativa - | Bastonetes |
| 95 <i>Tatumella</i> sp | Negativa - | Bastonetes |
| 98 <i>Corynebacterium</i> sp | Positiva + | Bastonetes |
| 104 <i>Corynebacterium</i> sp | Positiva + | Bastonetes |
| 109 <i>Vibrio</i> sp | Negativa - | Bastonetes |
| 120 <i>Corynebacterium</i> sp | Positiva + | Bastonetes |
| 124 <i>Vibrio</i> sp | Negativa - | Bastonetes |

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos sem exposição aos agrotóxicos

Após incubação das estirpes, os halos de inibição foram medidos e os valores interpretados de acordo com os parâmetros da Tabela 4. Os isolados analisados apresentaram perfis diversos, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado do antibiograma sem exposição aos agrotóxicos.

| Cepas | Halos (mm) | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Gram-positivas | Nal | Amp | Clo | Gen | Pen | Sut |
| 51 <i>Bacillus</i> sp | | 27,55 (S) | 36,50 (S) | 36,65 (S) | 30,00 (S) | 32,16 (S) | 38,05 (S) |
| 80 <i>Bacillus</i> sp | | 20,76 (S) | 32,19 (S) | 22,69 (S) | 28,26 (S) | 29,22 (S) | 41,30 (S) |
| 98 <i>Corynebacterium</i> sp | | 30,95 (S) | 47,52 (S) | 44,81 (S) | 36,51 (S) | 48,06 (S) | 47,00 (S) |
| 104 <i>Corynebacterium</i> sp | | 28,16 (S) | 29,37 (S) | 34,27 (S) | 26,99 (S) | 31,42 (S) | 30,23 (S) |
| 120 <i>Corynebacterium</i> sp | | 29,29 (S) | 45,17 (S) | 40,07 (S) | 34,04 (S) | 41,04 (S) | 35,86 (S) |
| Gram-negativas | | | | | | | |
| 70 <i>Serratia</i> sp | | 43,61 (S) | 34,29 (S) | 30,95 (S) | 38,59 (S) | 22,63 (R) | 43,67 (S) |
| 93 <i>Tatumella</i> sp | | 30,91 (S) | 21,47 (S) | 33,97 (S) | 24,25 (S) | 0 (R) | 33,19 (S) |
| 95 <i>Tatumella</i> sp | | 24,76 (S) | 12,07 (R) | 27,88 (S) | 20,67 (S) | 0 (R) | 31,84 (S) |
| 109 <i>Vibrio</i> sp | | 40,97 (S) | 26,48 (S) | 39,85 (S) | 30,15 (S) | 20,45 (R) | 33,45 (S) |
| 124 <i>Vibrio</i> sp | | 30,48 (S) | 0 (R) | 37,64 (S) | 24,70 (S) | 0 (R) | 35,01 (S) |

Obs: R = resistente; S = sensível

Fonte: elaborado pelo autor

Do total de estirpes isoladas, apenas as Gram-positivas foram sensíveis frente aos 6 antibióticos testados, enquanto as Gram-negativas se mostraram resistentes à penicilina. Além disso, as cepas 95 *Tatumella* e 124 *Vibrio* se mostraram resistentes também à ampicilina, em razão desses antimicrobianos terem como mecanismo de ação a inibição da síntese de parede celular e as bactérias Gram-negativas possuem uma parede mais complexa quando comparadas com as Gram-positivas. Segundo a Anvisa (2007), a permeabilidade limitada constitui uma propriedade da membrana celular externa de lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas, sendo esta responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina.

5.3 Suscetibilidade das estirpes bacterianas frente aos antimicrobianos após exposição à atrazina.

Os resultados de susceptibilidade das estirpes bacterianas após exposição à atrazina são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Resultado do antibiograma com exposição à 50ppm de atrazina.

| Cepas | | Halos (mm) | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Nal | Amp | Clo | Gen | Pen | Sut |
| Gram-positivas | | | | | | | |
| 51 | <i>Bacillus</i> sp | 20,97 (S) | 12,69 (R) | 22,66 (S) | 15,77 (S) | 0 (R) | 21,01 (S) |
| 80 | <i>Bacillus</i> sp | 17,11 (S) | 25,28 (R) | 17,15 (S) | 24,79 (S) | 23,88 (R) | 30,09 (S) |
| 98 | <i>Corynebacterium</i> sp | 19,82 (S) | 36,55 (R) | 23,98 (I) | 26,00 (S) | 35,47 (R) | 28,93 (S) |
| 104 | <i>Corynebacterium</i> sp | 22,71 (S) | 10,04 (S) | 20,07 (S) | 19,51 (S) | 0 (S) | 26,83 (S) |
| 120 | <i>Corynebacterium</i> sp | 17,38 (S) | 36,17 (S) | 23,87 (S) | 25,07 (S) | 36,86 (S) | 23,84 (S) |
| Gram-negativas | | | | | | | |
| 70 | <i>Serratia</i> sp | 28,24 (S) | 15,03 (R) | 27,35 (S) | 29,28 (S) | 0 (R) | 21,01 (S) |
| 93 | <i>Tatumella</i> sp | 24,32 (S) | 12,45 (R) | 17,89 (S) | 17,61 (S) | 0 (R) | 20,11 (S) |
| 95 | <i>Tatumella</i> sp | 22,69 (S) | 11,48 (R) | 21,69 (S) | 16,82 (S) | 0 (R) | 27,40 (S) |
| 109 | <i>Vibrio</i> sp | 27,75 (S) | 18,82 (R) | 27,79 (S) | 26,74 (S) | 0 (R) | 26,94 (S) |
| 124 | <i>Vibrio</i> sp | 26,40 (S) | 0 (R) | 28,75 (S) | 25,30 (S) | 0 (R) | 22,35 (S) |

Obs: I = Intermediário R = resistente; S = sensível

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 9 – Resultado do antibiograma com exposição à 100ppm de atrazina.

| Cepas | | Halos (mm) | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Nal | Amp | Clo | Gen | Pen | Sut |
| Gram-positivas | | | | | | | |
| 51 | <i>Bacillus</i> sp | 22,57 (S) | 10,80 (R) | 21,17 (S) | 18,61 (S) | 0 (R) | 23,37 (S) |
| 80 | <i>Bacillus</i> sp | 17,13 (S) | 26,61 (R) | 15,34 (S) | 22,66 (S) | 23,20 (R) | 37,50 (S) |
| 98 | <i>Corynebacterium</i> sp | 19,41 (S) | 19,41 (R) | 24,53 (I) | 28,56 (S) | 39,37 (R) | 28,30 (S) |
| 104 | <i>Corynebacterium</i> sp | 20,17 (S) | 12,71 (S) | 24,22 (S) | 19,58 (S) | 0 (S) | 24,34 (S) |
| 120 | <i>Corynebacterium</i> sp | 18,58 (S) | 37,17 (S) | 26,30 (S) | 26,71 (S) | 36,00 (S) | 23,28 (S) |
| Gram-negativas | | | | | | | |
| 70 | <i>Serratia</i> sp | 31,98 (S) | 22,62 (I) | 32,57 (S) | 32,63 (S) | 0 (R) | 25,91 (S) |
| 93 | <i>Tatumella</i> sp | 23,56 (S) | 14,97 (R) | 23,00 (S) | 18,92 (S) | 0 (R) | 26,59 (S) |
| 95 | <i>Tatumella</i> sp | 21,97 (S) | 10,38 (R) | 23,08 (S) | 16,06 (S) | 0 (R) | 23,44 (S) |
| 109 | <i>Vibrio</i> sp | 27,90 (S) | 20,74 (S) | 30,44 (S) | 29,25 (S) | 0 (R) | 32,64 (S) |
| 124 | <i>Vibrio</i> sp | 25,80 (S) | 0 (R) | 31,37 (S) | 23,27 (S) | 0 (R) | 30,36 (S) |

Obs: I = Intermediário R = resistente; S = sensível

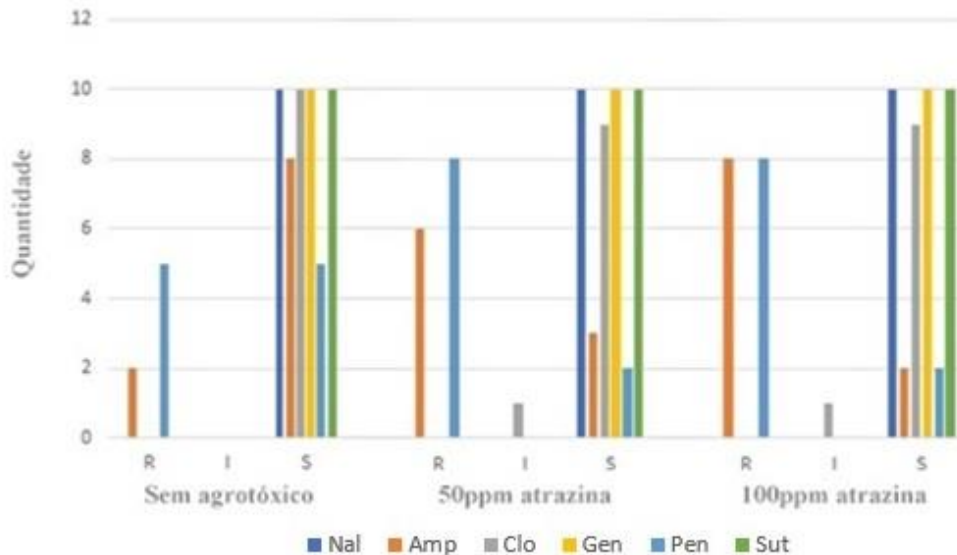
Fonte: elaborado pelo autor

Todas as bactérias isoladas que foram expostas a atrazina se mantiveram viáveis e cultiváveis nas concentrações de 50ppm e 100ppm. Santos (2013) encontrou resultados similares ao isolar bactérias oriundas do Rio Pacoti, no Ceará, que toleraram concentrações que variaram entre 100ppm a 200ppm.

Com relação a variação na susceptibilidade, observou-se que o maior perfil de resistência, tanto na concentração de 50ppm quanto na de 100ppm de atrazina, foi referente aos antibióticos pertencentes ao grupo de inibição da síntese de parede celular: Ampicilina e Penicilina (Gráfico 3). Martins (2015), ao estudar a bioprospecção de bactérias degradadoras de atrazina e outros agrotóxicos em diferentes pontos do estuário do Rio Jaguaribe, encontrou

o mesmo resultado de resistência para os mesmos antibióticos, seguido do sulfazotrim e ácido nalidíxico, pertencentes ao Grupo 3.

Gráfico 3 - Perfil de susceptibilidade bacteriana após exposição a atrazina.



Fonte: elaborado pelo autor

Um estudo realizado com o intuito de se analisar a diversidade do gênero *Vibrio*, isolados de amostras de água e de sedimento de ambientes estuarinos do Ceará, também constatou uma maior resistência bacteriana a penicilina seguida da ampicilina na mesma região (MENEZES, 2017).

Do total de antibióticos testados, somente o Cloranfenicol apresentou resistência intermediária após exposição a atrazina, o que pode indicar, segundo Peixoto (2012), uma diminuição na eficiência do antimicrobiano sobre a microbiota alvo, necessitando de maiores concentrações desses fármacos no combate de infecções.

Todas as cepas isoladas, mesmo quando expostas a atrazina, permaneceram sensíveis aos antimicrobianos Ácido Nalidíxico, Gentamicina e Sulfazotrim. Oliveira (2018), também encontrou susceptibilidade expressiva de cepas frente à Gentamicina, o que, segundo Zimmerman (2010), um possível efeito para isso seria a redução do número de prescrições no uso desses antibióticos e, conseqüentemente, a diminuição da resistência bacteriana a esses fármacos, uma vez que o uso indiscriminado desses antimicrobianos causa uma pressão seletiva de modo a aumentar a resistência frente a estas substâncias.

Em outros estudos, uma grande proporção de resistência à ampicilina e de susceptibilidade à Gentamicina e Cloranfenicol também foram constatadas em bactérias isoladas do conteúdo intestinal e das brânquias de peixes marinhos capturados no Chile e Índia (MIRANDA; ZEMELMAN, 2001, GHOSH; MANDAL, 2010).

5.4 Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos com exposição ao glifosato.

Os resultados das estirpes submetidas ao teste de antibiograma com adição de 50ppm e 100ppm de glifosato são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Resultado do antibiograma com exposição à 50ppm de glifosato.

| Cepas | Halos (mm) | | | | | |
|-------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Nal | Amp | Clo | Gen | Pen | Sut |
| Gram-positivas | | | | | | |
| 51 <i>Bacillus</i> sp | 24,88 (S) | 27,76 (R) | 30,69 (S) | 29,36 (S) | 25,07 (R) | 33,55 (S) |
| 80 <i>Bacillus</i> sp | 16,94 (S) | 25,75 (R) | 15,35 (I) | 24,26 (S) | 22,04 (R) | 29,23 (S) |
| 98 <i>Corynebacterium</i> sp | 20,32 (S) | 17,36 (R) | 23,59 (S) | 25,04 (S) | 12,34 (R) | 22,59 (S) |
| 104 <i>Corynebacterium</i> sp | 21,54 (S) | 18,43 (R) | 25,89 (S) | 21,27 (S) | 15,58 (R) | 28,95 (S) |
| 120 <i>Corynebacterium</i> sp | 22,51 (S) | 0 (R) | 23,50 (S) | 25,80 (S) | 0 (R) | 27,93 (S) |
| Gram-negativas | | | | | | |
| 70 <i>Serratia</i> sp | 25,06 (S) | 11,06 (R) | 23,93 (S) | 26,92 (S) | 0 (R) | 20,22 (S) |
| 93 <i>Tatumella</i> sp | 21,36 (S) | 22,09 (S) | 14,05 (I) | 0 (R) | 0 (R) | 17,73 (S) |
| 95 <i>Tatumella</i> sp | 17,47 (I) | 0 (R) | 19,79 (S) | 13,24 (R) | 0 (R) | 14,57 (S) |
| 109 <i>Vibrio</i> sp | 30,50 (S) | 20,36 (S) | 27,25 (S) | 21,83 (S) | 0 (R) | 26,39 (S) |
| 124 <i>Vibrio</i> sp | 21,79 (S) | 0 (R) | 26,63 (S) | 16,62 (S) | 0 (R) | 25,09 (S) |

Obs: I = Intermediário R = resistente; S = sensível

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 11 – Resultado do antibiograma com exposição à 100ppm de glifosato.

| Cepas | Halos (mm) | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Gram-positivas | Nal | Amp | Clo | Gen | Pen | Sut |
| 51 <i>Bacillus</i> sp | | 24,24 (S) | 28,08 (R) | 30,04 (S) | 29,48 (S) | 24,26 (R) | 32,22 (S) |
| 80 <i>Bacillus</i> sp | | 16,70 (S) | 25,81 (R) | 13,27 (R) | 26,73 (S) | 23,78 (R) | 31,54 (S) |
| 98* <i>Corynebacterium</i> sp | | | | | | | |
| 104 <i>Corynebacterium</i> sp | | 10,25 (R) | 18,21 (R) | 26,03 (S) | 26,86 (S) | 13,95 (R) | 29,60 (S) |
| 120 <i>Corynebacterium</i> sp | | 20,01 (S) | 10,60 (R) | 19,00 (S) | 15,82 (S) | 0 (R) | 18,99 (S) |
| | Gram-negativas | | | | | | |
| 70 <i>Serratia</i> sp | | 25,65 (S) | 10,59 (R) | 27,25 (S) | 26,61 (S) | 0 (R) | 21,69 (S) |
| 93 <i>Tatumella</i> sp | | 19,84 (S) | 13,87 (I) | 19,26 (S) | 14,24 (I) | 0 (R) | 17,83 (S) |
| 95 <i>Tatumella</i> sp | | 16,30 (I) | 0 (R) | 10,18 (R) | 12,92 (R) | 0 (R) | 13,08 (I) |
| 109 <i>Vibrio</i> sp | | 29,48 (S) | 19,09 (S) | 29,05 (S) | 21,77 (S) | 0 (R) | 26,11 (S) |
| 124 <i>Vibrio</i> sp | | 21,68 (S) | 0 (R) | 22,83 (S) | 17,27 (S) | 0 (R) | 22,08 (S) |

Obs: I = Intermediário R = resistente; S = sensível * Não houve crescimento bacteriano no tubo e na placa.

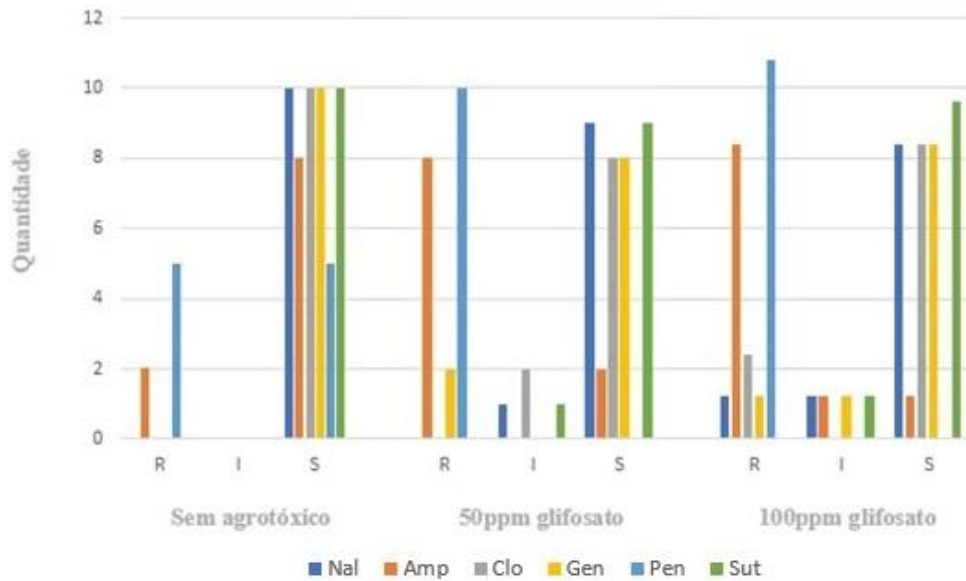
Fonte: elaborado pelo autor

Todas as bactérias isoladas que foram expostas ao glifosato se mantiveram viáveis e cultiváveis na concentração de 50ppm. Já na concentração de 100ppm apenas a cepa 98 não teve crescimento no tubo de ensaio e na placa de Petri. Soares *et al.*, (2008) observou que o glifosato tem efeito sobre a germinação dos esporos do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, quando expostos a concentrações que variaram entre 100ppm e 20000ppm.

Com relação a variação na susceptibilidade, observou-se que o maior perfil de resistência, nas duas concentrações utilizadas, continuou sendo referente aos antibióticos pertencentes ao grupo 1: Ampicilina e Penicilina (Gráfico 4). Contudo, houve variação na susceptibilidade da cepa 95 *Tatumella* em 50ppm e 100ppm e da cepa 104 *Corynebacterium* em 100ppm frente aos antimicrobianos Ácido Nalidíxico, Cloranfenicol e Gentamicina, uma vez que apresentaram resistência a esses antibióticos.

Além disso, as cepas 80 *Bacillus* e 93 *Tatumella* apresentaram respostas diferentes frente aos antimicrobianos Cloranfenicol e Gentamicina.

Gráfico 4 - Perfil de susceptibilidade bacteriana após exposição ao glifosato.



Fonte: elaborado pelo autor

Um estudo realizado por Kurenbach *et al.*, (2015) identificou alterações na bomba de efluxo em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* após sua exposição ao glifosato, conferindo assim, resistência ao aminoglicosídeo canamicina e à fluoroquinolona ciprofloxacina, sendo este considerado um grande problema, em razão destes serem utilizados no controle de patógenos insensíveis aos beta-lactâmicos.

Ademais, foram observados perfis de resistência intermediária ente as culturas expostas frente aos antibióticos Ácido Nalidíxico, Cloranfenicol e Sulfazotrim. Depois de expostas à concentração maior do pesticida (100ppm), houve resistência intermediária em dois outros antibióticos: Ampicilina e Gentamicina, enquanto se teve uma mudança no perfil de resistência ao Cloranfenicol, que passou de resistência intermediária para resistente.

Embora a transferência horizontal de genes por meios naturais não tenha sido demonstrada conclusivamente, a resistência ao glifosato foi identificada em muitos gêneros de bactérias, desde a intensificação do uso deste herbicida (LIU *et al.*, 2013; PRIESTMAN *et al.*, 2005; STAUB *et al.*, 2012).

5.5 Índice de múltipla resistência a antimicrobianos

A Tabela 12 mostra os resultados do índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR), após exposição a concentrações de 50ppm e 100ppm de glifosato e atrazina, determinado pela razão entre o número de antibióticos ao qual a cepa demonstrou resistência e o número total de antibióticos testados, considerando-se valores iguais ou superiores a 0,2 como indicativos de resistência múltipla (KRUMPERMAN, 1983).

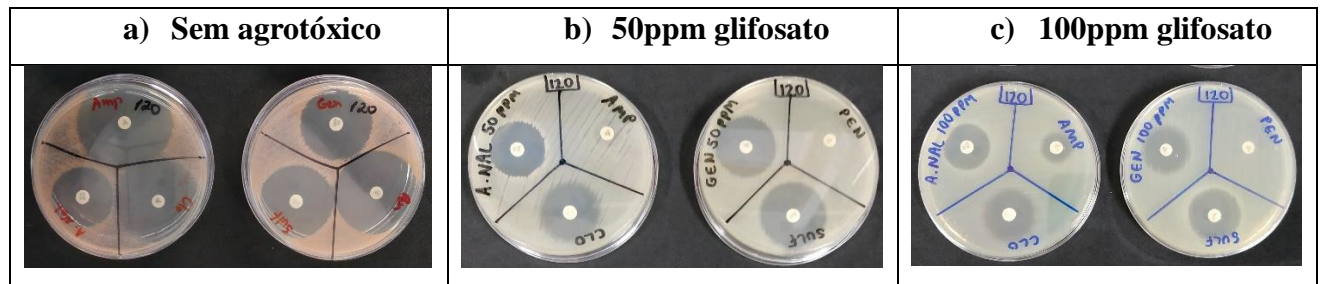
Tabela 12 – Índice de múltipla resistência a antimicrobianos em extirpes bacterianas expostas a concentrações de atrazina e glifosato.

| Cepas | Concentração | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------|------|-----------|------|----------|------|------------------|------|
| | 50ppm | | | | 100ppm | | | |
| | Atrazina | | Glifosato | | Atrazina | | Glifosato | |
| | Perfil | MAR | Perfil | MAR | Perfil | MAR | Perfil | MAR |
| 51 <i>Bacillus</i> sp | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 |
| 70 <i>Serratia</i> sp | - | - | Amp | 0,16 | Amp | 0,16 | Amp | 0,16 |
| 80 <i>Bacillus</i> sp | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Amp,Clo, Pen | 0,5 |
| 93 <i>Tatumella</i> sp | Amp | 0,16 | Gen | 0,16 | Amp | 0,16 | Gen | 0,16 |
| 95 <i>Tatumella</i> sp | - | - | Gen | 0,16 | - | - | Gen | 0,16 |
| 98 <i>Corynebacterium</i> sp | - | - | Amp, Pen | 0,33 | - | - | - | - |
| 104 <i>Corynebacterium</i> sp | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Amp, Pen | 0,33 | Nal, Amp, Pen | 0,5 |
| 109 <i>Vibrio</i> sp | - | - | - | - | Amp | 0,16 | - | - |
| 120 <i>Corynebacterium</i> sp | - | - | Amp, Pen | 0,33 | - | - | Amp, Pen | 0,33 |
| 124 <i>Vibrio</i> sp | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados mostraram que em 50ppm, houve a presença de bactérias multirresistentes até 2 antimicrobianos, sendo os mais frequentes Ampicilina e Penicilina. Já em 100ppm houve a presença de bactérias multirresistentes até 2 antimicrobianos por ação da atrazina e 3 antimicrobianos pela ação do glifosato. Como resultado da ação do glifosato sobre as bactérias, tem-se como exemplo a cepa 120 que após ser exposta a 50ppm e 100ppm do agrotóxico, tornou-se resistente a Ampicilina e Penicilina, diminuiu a sensibilidade frente aos outros antimicrobianos, além de perder sua pigmentação rosada (Figura 10).

Figura 10 - Imagens dos resultados de antibiograma da cepa 120 antes e após exposição a concentrações do pesticida glifosato.



Fonte: acervo do autor

Oliveira (2018), encontrou resultados similares no índice de múltipla resistência frente a 8 antibióticos testado, ao analisar a resistência cruzada glifosato-antibiótico em bactérias Gram-negativas. Vasconcelos (2010), ao analisar o perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* no açude Santo Anastácio no Ceará, encontrou valores no índice de múltipla resistência que variaram entre 25% a 50%, indicando um elevado grau de resistência a diversos antimicrobianos.

O glifosato se mostrou mais eficiente na co-seleção de bactérias resistentes quando comparado com a atrazina. Entretanto, deve-se levar em conta que a solução comercial utilizada no presente trabalho contém, além do glifosato, outros ingredientes que poderiam estar atuando sobre os microrganismos e, conseqüentemente, influenciando nos resultados.

6 CONCLUSÃO

Após todos os testes realizados, observou-se uma variação no perfil de resposta das bactérias após exposição aos herbicidas. Foi possível determinar antibióticos que apresentam a resistência cruzada com os agrotóxicos utilizados. Além disso, tanto a ação da atrazina, quanto do glifosato desencadearam um alto índice de resistência, principalmente aos antibióticos pertencentes ao grupo de inibição da síntese de parede celular: Ampicilina e Penicilina. O índice de múltipla resistência mostrou bactérias resistentes até 3 antibióticos diferentes.

A presença de cepas multirresistentes após ação dos agrotóxicos indicam uma pressão seletiva exercida devido à presença dessas substâncias no ambiente. O uso indiscriminado de antimicrobianos exerce uma enorme pressão seletiva para a manutenção e ampliação da resistência bacteriana. Embora não se possa eliminar o uso de antimicrobianos, a administração racional desses agentes não apenas exige uma seleção criteriosa do antimicrobiano e da duração da terapia, como também sua indicação apropriada.

A liberação e consumo dos agrotóxicos vem crescendo desenfreadamente ao longo dos anos, principalmente no Brasil. Nesse cenário, essas substâncias apresentam um importante risco à saúde da população, bem como para o meio ambiente, devendo por isso, serem utilizadas sob estrita orientação. O modo e a extensão com que esses produtos vêm sendo utilizados têm trazido efeitos prejudiciais muito maiores que qualquer benefício. Uma possível medida para diminuir o impacto desses agrotóxicos no ambiente seria o uso de biopesticidas. Além disso, outra alternativa seria o consumo de alimentos 100% orgânicos livres dessas substâncias.

Ademais, o próximo passo da pesquisa será a realização de testes como a cura de plasmídeo a fim de determinar a origem da resistência, se plasmidial ou potencialmente cromossômica, para uma melhor caracterização do perfil fenotípico de resistência dos isolados bacterianos.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE JUNIOR, O. P. A.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 17-25, jul. 2002. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400014>. Acesso em 24 abr. 2019.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. a14.pdf (Versão 1.1). 2016. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/a14.pdf/76773817-be41-4334-9846-77bd559f9e80?version=1.1&download=true>>. Acesso em: 24 abr. 2019.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANTIMICROBIANOS – BASES TEÓRICAS E USO CLÍNICO. 2007a. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/mecanismos.htm >. Acesso em: 26 abr. 2019.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. G01++Glifosato.pdf (Versão 1.0). 2016. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/G01%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4?version=1.0&download=true>>. Acesso em: 24 abr. 2019.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESISTÊNCIA MICROBIANA – MECANISMOS E IMPACTO CLÍNICO. 2007b. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 26 abr. 2019.
- ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-05092002-161341/pt-br.php>>. Acesso em: 25 abr. 2019.
- ARAÚJO, A. S. F. MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799-804, fev. 2003. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163844/1/Araujo-Effect-6438.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2019.
- ARAUJO, E. **Impacto dos Agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente**. Rede mobilizadores. 2016. Disponível em: < <http://www.mobilizadores.org.br/wp-content/uploads/2016/08/Cartilha-Agrotoxicos-final.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019
- BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. *In: Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides*. New York: Springer-Verlag New York Inc, 1970. 29-92p. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=SWDmBwAAQBAJ&pg=PA29&lpg=PA29&dq=Factors+influencing+the+adsorption,+desorption,+and+movement+of+pesticides+in+soil.+In:+Single+Pesticide+Volume:+The+Triazine+Herbicides&source=bl&ots=pM0GMpd2F2&sig=ACfU3U3tS1zy31QXdGdwYASoRgW5NgyrJg&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwjaoVtp68biAhX5K7kGHRI5AnQQ6AEwAnoECAkQAQ#v=one>>

page&q=Factors%20influencing%20the%20adsorption%2C%20desorption%2C%20and%20movement%20of%20pesticides%20in%20soil.%20In%3A%20Single%20Pesticide%20Volume%3A%20The%20Triazine%20Herbicides&f=false>. Acesso em: 24 abr. 2019.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013. Disponível em:<<http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/3264/Mecanismos%20de%20Resist%C3%Aancia%20aos%20Antibi%C3%B3ticos%20%20Maria%20Galv%C3%A3o%20Ba.pdf?sequence=1>>. Acesso em 26 abr. 2019.

BARRETO, F. M. S; NASCIMENTO, R. F. Caracterização preliminar da carga de agrotóxico presente na água subterrânea em Tianguá-Ceará (Brasil). *In*: Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 13, 2004, São Paulo. **Anais...** Fortaleza: ABAS, 2004. p. 1-20. Disponível em:< <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/23402/15491>>. Acesso em: 23 abr. 2019

BARRETO, F. M. S. **Contaminação da água subterrânea por pesticidas e nitrato no Município de Tianguá, Ceará**, 2006. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2006. Disponível em:< http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/16725/1/2006_tese_fmsbarreto.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2019.

BORSOI A *et al.* Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente, **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 3, n. 1, p. 86-100, jan. 2014. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/284663840_Agrotoxicos_historico_atualidades_e_meio_ambiente >. Acesso em: 01 jun. 2019.

BATTAGLIN, W. A., MEYER, M. T., KUIVILA, K. M., DIETZE, J. E. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American Water Resources Association**, [S. l.], v. 50, p. 275-290, abr. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jawr.12159>>. Acesso em: 29 maio 2019.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7,802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 8 jan. 2002. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#art98>. Acesso em: 19 abr. 2019.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Legislação Federal de agrotóxicos e afins. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília, **Diário Oficial da União**, 12 jul 1989. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 21 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. 2016. Disponível em:< http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BRASIL. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Dispõe sobre requisitos para regularização de produtos agrotóxicos. Ministério da Saúde. Brasília, **Diário Oficial da União**, 1992. Disponível em:<
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html>. Acesso em: 21 abr. 2019.

BENVENUTO, F. *et al.* Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Bioanalysis Chemical**, [S. l.], v. 397, n. 7, p. 2791-2805, ago. 2010. Disponível em:<
https://www.researchgate.net/publication/45289632_Simultaneous_determination_of_triazine_s_and_their_main_transformation_products_in_surface_and_urban_wastewater_by_ultra-high-pressure_liquid_chromatography-tandem_mass_spectrometry>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CABRAL, M. F.; *et al.* Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/eq/v28n2/a05v28n2.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CARNEIRO, F. F. Ceará é o 3º maior consumidor proporcional de agrotóxico do País. **Jornal O Povo**, Fortaleza, 20 out. 2015. Disponível em:<
<https://www2.opovo.com.br/app/opovo/cotidiano/2015/10/20/noticiasjornalcotidiano,3521491/ceara-e-o-3-maior-consumidor-proporcional-de-agrotoxico-do-pais.shtml>>. Acesso em 22 abr. 2019.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L.F.; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 437-445, abr. 2014. Disponível em:< <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/12498/pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

CHEVRIER, C. *et al.* Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. **Environmental Health Perspectives**, [S. l.], v. 119, n. 7, p. 1034-1041, jul. 2011. Disponível em:<
https://pdfs.semanticscholar.org/d364/0cb9c79d42194be1b45eae0adc42525dc95f.pdf?_ga=2.14962366.90275463.1560062304-1598585539.1559716115>. Acesso em: 24 abr. 2019.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. M100S, ed. 26. Wayne, PA, USA, 2016.

COLLA, L. M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.3, p. 809-813, maio/jun. 2008. Disponível em:<
<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n3/a16v32n3.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e

dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 397/2008. Disponível em:< <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

COUTINHO, C. F. B. *et al.* Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [S. l.], v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005. Disponível em:< <https://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/4469/3518>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CRAGIN, L. A. *et al.* Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, [S. l.], v. 111, n. 08, p. 1293-1301, jan./out. 2011. Disponível em:< https://www.academia.edu/15853091/Menstrual_cycle_characteristics_and_reproductive_hormone_levels_in_women_exposed_to_atrazine_in_drinking_water>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CUNHA, L. F. Transgênicos: enfim, aprovados. **Globo Rural**, [S. l.], v. 234, n. 1, p. 38-44, abr. 2005. Disponível em:< http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/0,3916,942799-1484-7,00.html>. Acesso em: 25 abr. 2019.

DUARTE, M. W. *et al.* **Atividade Antimicrobiana e Produção e Enzimas Extracelulares por Actinomicetos Isolados de Solo**. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 2009. Disponível em:< <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/18934>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Principais herbicidas indicados para cultura de milho no sistema plantio direto e no preparo convencional do solo. 2006. Disponível em:< http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do61_13.htm>. Acesso em: 21 jun. 2019.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Pesticides. Disponível em:<<https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

FIGUEIREDO, E. A. P. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 421-427, Dec. 2007. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2007000400003>. Acesso em: 06 jun. 2019.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Glifosato**: Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. Santo André: ACADCOM Gráfica e Editora Ltda, 2005. Disponível em:<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_glifosatoID-VCQ0aRyNYE.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2019.

GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, Rivelino M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 462-467, fev. 2013. Disponível em:< http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol36No3_462_16-NT12321.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2019.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 695-706, maio/jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300032>. Acesso em: 02 jun. 2019.

GHOSH K, MANDAL S. Antibiotic resistant bacteria in consumable fishes from Digha coast, West Bengal. **Proceedings of the Zoological Society**, [S.l.], v. 63, p. 13-20, jun. 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/225618979_Antibiotic_resistant_bacteria_in_consumable_fishes_from_Digha_coast_West_Bengal_India>. Acesso em: 16 jun. 2019.

GOTTESMAN, B. S. *et al.* Impact of quinolone restriction on resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from urine by culture in a community setting. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, p. 869-875, set. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/49/6/869/333916> >. Acesso em: 26 abr. 2019.

GRAYMORE, M. *et al.* Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, [S. l.], v. 26, n.7-8, p. 483-495, jun. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412001000319>>. Acesso em: 02 jun 2019.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta de Novos Agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n3/35.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

HALLBERG, G. R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S. l.], v. 26, n. 3-4, p. 299-367, out. 1989. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167880989900170>>. Acesso em: 03 jun 2019.

HASE, Y. *et al.* Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 366, n. 01, p. 66-72, fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0702493X>>. Acesso em: 30 maio 2019.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil: Boletim 2019. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos> >. Acesso em: 22 abr. 2019.

KOBAYASHI, Cláudia Castelo Branco Artiaga *et al.* Resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 3, p. 344-348, June 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000300017>. Acesso em: 25 maio. 2019.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**,

Washington. v. 46, p. 165-170, jul. 1983. Disponível em:<
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239283/pdf/aem00164-0175.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

KURENBACH, Brigitta; MARJOSHI, Delphine; AMÁBILE-CUEVAS, Carlos F.; FERGUSON, Gayle C.; GODSOE, William; GIBSON, Paddy; HEINEMANN, Jack A. Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **MBio**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. e00009-15, mar. 2015. Disponível em: <https://mbio.asm.org/content/6/2/e00009-15.short> . Acesso em: 05 set. 2018.

LIU, C. M.; MCLEAN, P.A.; SOOKDEO, C. C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the Family Rhizobiaceae. **Applied Environmental Microbiology**, [S. l.] v. 57, p. 1799-1804, jun. 1991. Disponível em:<
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183471/pdf/aem00059-0231.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

LIU, Y.B., LONG M.X., YIN, Y.J., SI, M.R., ZHANG, L., LU, Z.Q., WANG, Y., SHEN, X.H., 2013. Physiological roles of mycothiol in detoxification and tolerance to multiple poisonous chemicals in *Corynebacterium glutamicum*. **Archives of Microbiology**, [S. l.]. v. 195, p. 419-429, abr. 2013. Disponível em:<
https://www.researchgate.net/publication/236328321_Physiological_roles_of_mycothiol_in_deto_xification_and_tolerance_to_multiple_poisonous_chemicals_in_Corynebacterium_glutamicum>. Acesso em: 17 jun. 2019.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011. Disponível em:< <http://aspta.org.br/wp-content/uploads/2011/09/Agrotoxicos-no-Brasil-mobile.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSONLILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for 61 interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.] v. 18, n. 3, p. 268-281, mar. 2012. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14616323>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

MARECICK, R. *et al.* Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). **Biodegradation**, Poznan v.19, p. 293-301, jun. 2008.

MARTINS, S. R. **Bioprospecção de bactérias degradadoras de agrotóxicos em estuário do Rio Jaguaribe (Ceará, Brasil)**, 2015. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Ambientais. 60f. Universidade Federal do Ceará, 2015.

MELI, G.; BAGNATI, R.; FANELLI, R.; BENFENATTI, E.; AIROLDI, L. Metabolic profile of atrazine and Nnitrosoatrazine in rat urine. **Bulletin of Environmental Contamination and**

Toxicology, [S. l.]. v.48, n.5, p. 701-708, maio. 1992. Disponível em:<
https://www.academia.edu/37367213/Metabolic_profile_of_atrazine_and_N-nitrosoatrazine_in_rat_urine?auto=download>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MENEZES, F. G. R. et al. Pathogenic *Vibrio* species isolated from estuarine environments (Ceará, Brazil) - antimicrobial resistance and virulence potential profiles. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 1175-1188, jun. 2017. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652017000301175>. Acesso em 16 jun. 2019.

MIGEOT, V. *et al.* Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: a historic cohort study. **Environmental Research**, [S. l.]. v. 122, p. 58-64, jan. 2013. Disponível em:<
<http://medphar.univ-poitiers.fr/santepub/images/documents/article5.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antibiotic resistant bacteria in fish from Concepción Bay. **Marine Pollution Bulletin**, Chile. v.42, p. 1096-1102, nov. 2001.

MOGADATI, P. S.; LOUIS, J. B.; ROSEN, J. D. Determination of glyphosate and its metabolite, (aminomethyl) phosphonic acid, in river water. **Journal of AOC International**, [S. l.]. v. 79, n.1, p. 157-162, dez. 1996.

MONTEIRO, D; FONTENELE, D. P; CAVALCANTE, R. M. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MOBILIDADE E DESTINO DOS AGROTÓXICOS NA REGIÃO DA BACIA DO RIO JAGUARIBE - CE. In: **62ª Reunião Anual da SBPC**, 2011, Natal. Ciências do mar: herança para o futuro., 2011. Disponível em:<
<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/4883.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J.S. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro. v.7, n.2, p. 299-311, mar. 2002. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/csc/v7n2/10249.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

MOREIRA, L. B. Princípios para o uso racional de antimicrobianos. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre. v. 48, p. 118-120, 2004.

NEWTON, M. *et al.* Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forest..**Journal of Agriculture and Food Chemistry**, [S. l.]. v.42, p. 1795-1802, ago. 1994. Disponível em:< <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00044a043>>. Acesso em: 25 abr. 2019

OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. F. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, São Paulo. v. 10, n. 1, p. 189-197, jan./fev, 2008. Disponível em:< <https://www.fen.ufg.br/revista/v10/n1/pdf/v10n1a17.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

OLIVEIRA, R. V. F. de. **Resistência cruzada glifosato-antibiótico em bactérias gram negativas de amostras de solo de diferentes sistemas de manejo agrícola em Eusébio-CE**. 2018. 70 f. TCC- Trabalho de Conclusão de Curso- (Graduação em Ciências Ambientais) -

Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em:<http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/40988/1/2018_tcc_rvfdeoliveira.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2019.

OLIVEIRA-SILVA JJ, MEYER A. O Sistema de Notificação das Intoxicações: o fluxograma da joieira. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 317-326, 2003.

OMS. Organização Mundial da Saúde. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde; 1997. Disponível em:<<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

PEIXOTO, J. R. O. **Diversidade e padrões de susceptibilidade a antimicrobianos em bactérias isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e do ambiente aquático**, 2012. 161 f. Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2012. Disponível em:< <http://www.repositoriobib.ufc.br/00000D/00000D87.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

PELAEZ, V; TERRA, F.; SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, [S. l.]. v. 36, n. 1, p. 27-48, maio. 2010. Disponível em:< <https://revistas.ufpr.br/economia/article/view/20523/13714>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): Da descoberta da Penicilina(1928) ao Prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, [S. l.]. v. 6, p. 129-151, 2005. Disponível em:< <https://ler.letras.up.pt/uploads/ficheiros/3379.pdf>>. Acesso em 26 abr. 2019.

PERES, F; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.384p. Disponível em:< <http://books.scielo.org/id/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

PINHEIRO, J. C. V.; AMARAL, C. R.; CARVALHO, R. M. Análise da viabilidade sócio-ambiental da fruticultura irrigada no baixo Jaguaribe, Ceará. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, Ceará. v.4, n.1, p. 3-17, jan- abr. 2010. Disponível em:< <https://rgsa.emnuvens.com.br/rgsa/article/view/210/85>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

PONTES, A. G. V. *et al.* Os perímetros irrigados como estratégia geopolítica para o desenvolvimento do semiárido e suas implicações à saúde, ao trabalho e ao ambiente. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro. v. 18, n. 11, p. 3.213-3.222, maio. 2013. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/csc/v18n11/12.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

PRIESTMAN, M. A., FUNKE, T., SINGH, I.M., CRUPPER, S.S., SCHÖNBRUNN, E., 2005. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is

insensitive to glyphosate. **Federation of European Biochemical Societies**, [S. l.]. v. 579, p. 728-732. jan. 2005.

RAJKOVIC, V. *et al.* Atrazine-induced degranulation thyroid mast cells in peripubertal and adult rats. **Central European Journal of Biology**, [S. l.]. v.7 p. 25-32, fev. 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/257908315_Atrazine-induced_degranulation_of_thyroid_mast_cells_in_peripubertal_and_adult_rats>. Acesso em: 23 abr. 2019.

RANGASAMY, KIRUBAKARAN; ATHIAPPAN, M. DEVARAJAN, NATARAJAN; PARRAY, JAVID. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.]. v. 105, p. 153-165, fev. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017300918> . Acesso em: 27 abr. 2019.

RICE, L.; BONOMO, R. **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial**: Antibiotics in Laboratory Medicine. Nova York: Victor Lorian, M. D., 5 th edition. 2005

RIGOTTO, R; VASCONCELOS, D; ROCHA, M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. In: **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 30, n. 7, p. 1-3, jul, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2014000701360&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 22 abr. 2019.

SÁEZ-LLORENS, X. *et al.* Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, [S. l.]. v. 19, p. 200-206, mar. 2000.

SANTOS, D. R. **Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de agrotóxicos isoladas do rio Pacotí- Ce**, 2013. 57f. Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/30885/1/2013_tcc_dr dossantos.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2019.

SENE, L. *et al.* Novos aspectos na biodegradação da atrazina. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 53, n. 2, p. 487-496, abril de 2010. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000200030&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 07 jun. 2019.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Workshop Mercado Brasileiro de Fitossanitários: Avaliação da exportação de misturadores, abastecedores e aplicadores de agrotóxicos. **Anais...** Brasília, 2009.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Zona de Ocorrência**. Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b9.pdf> Acesso em: 23 abr. 2019.

SOARES, R. M. *et al.* Utilização de glifosato para o controle de ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 473-477, abr. 2008. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-

204X2008000400005&lng=en&nrm=iso>. Disponível em:<
<http://www.scielo.br/pdf/pab/v43n4/a05v43n4.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

STAUB, J.M., BRAND, L., TRAN, M., KONG, Y., ROGERS, S.G., 2012. Bacterial glyphosate-resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnology*, [S. l.]. v.39, p. 641-647, nov. 2012.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3. ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2014. Disponível em:<
<https://cardiologiamedicinaumsa.files.wordpress.com/2017/07/antibioticos-y-quimioterapicos-para-el-clinico.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p. 829-833, jul-ago. 2006. Disponível em:<
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400034>. Acesso em: 26 abr. 2019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap. 3 - Observando microrganismos no microscópio, p. 69-70, cap 14, 400-403.

TSUI, M.T.K.; WANG, W.X.; CHU, L.M. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, [S. l.]. v. 138, n. 1, p. 59-68, nov. 2005.

UNIVERSIDADE DE CAXIAS. **Cartilha sobre Resíduos de Agrotóxicos**. 2015. Disponível em:<<https://www.uces.br/site/midia/arquivos/Cartilha-Pesticidas.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

VASCONCELOS, F. R.; REBOUÇAS, R. H.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SOUSA, O. V; VIEIRA, R. H. S. F. Perfil de Resistência Antimicrobiana de *Escherichia coli* Isoladas do Açude Santo Anástacio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v.77, n.3, p. 405-410, jul-set. 2010. Disponível em:<
http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/vieira.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2019.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 69-96, set. 2006. Disponível em:<
https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%20C3%ADmicos_P.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2019.

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

ZIMERMAN, R. A.; Boletim 03 - Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana. **Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados**. Ministério da Saúde, Brasília, 2010. Disponível em:<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1348-uso-indiscriminado-antimicrobianos-e-resistencia-microbiana-boletim-n-03-8&category_slug=uso-racional-medicamentos-685&Itemid=965>. Acesso em 15 jun. 2019.

APÊNDICE A

Lista dos reagentes e meios de cultura utilizados no presente estudo e suas respectivas marcas.



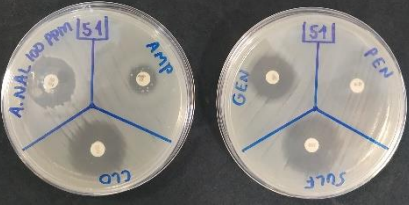


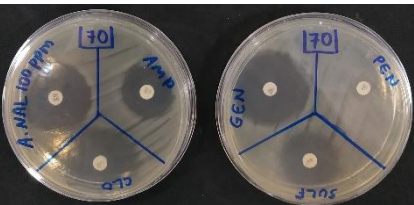
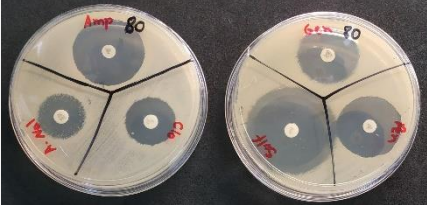
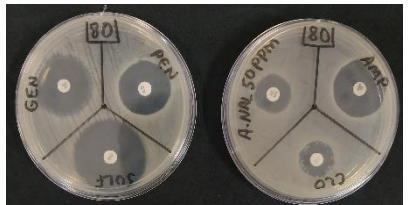




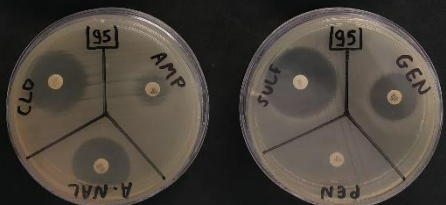


| Reagentes e Meios de Cultura | Marca |
|---|--------------|
| Alcool 95% | Vetec |
| Ágar <i>Mueller-Hinton</i> | Difco |
| Ágar tríptico de soja – TSA | Difco |
| Atrazina | - |
| Caldo triptona soja – TSB | Merck |
| Cristal Violeta | Vetec |
| Glifosato (48% glifosato; 38% ácido de glifosato) | Nufarm |
| Iodeto de potássio | Merck |
| NaCl | Vetec |
| Safranina | Merk |

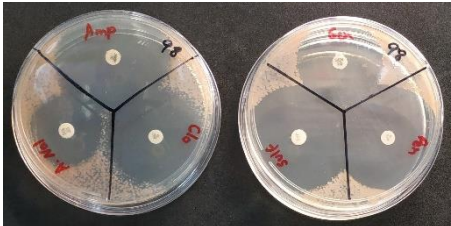

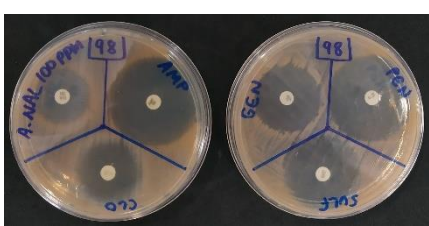
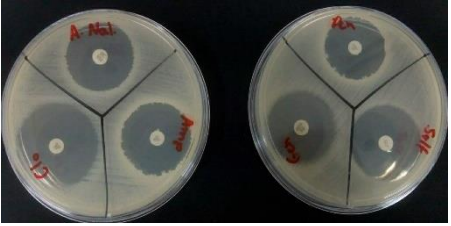
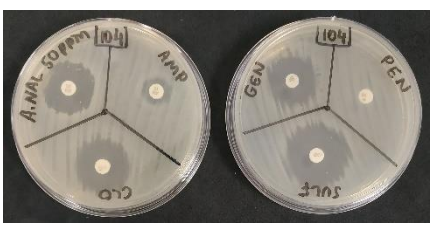
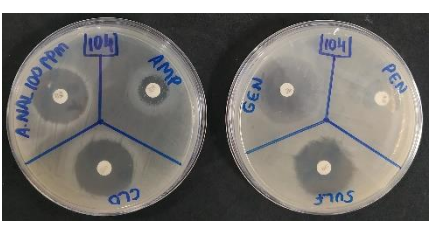

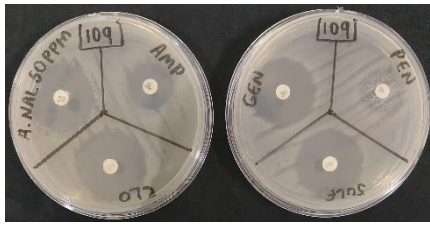
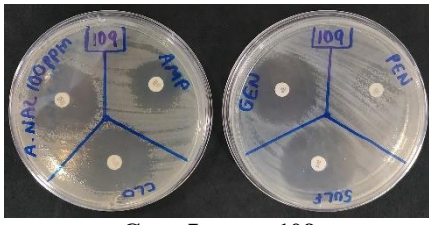
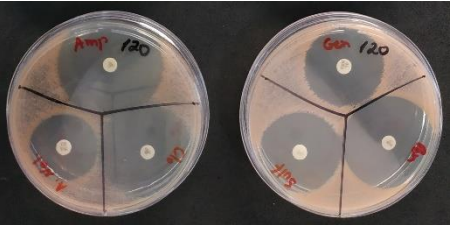
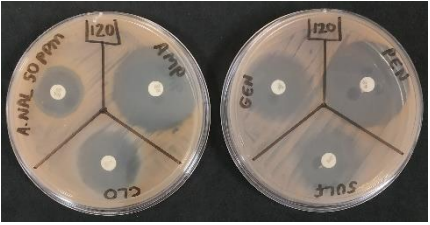

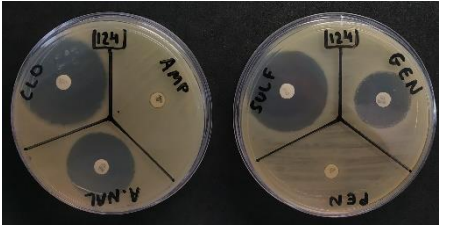
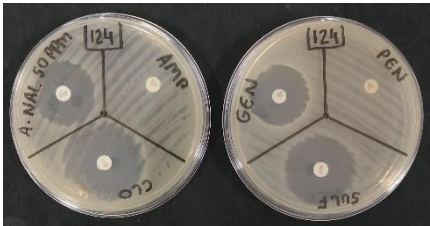
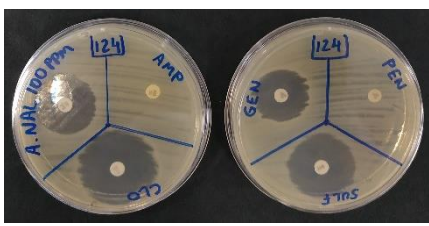


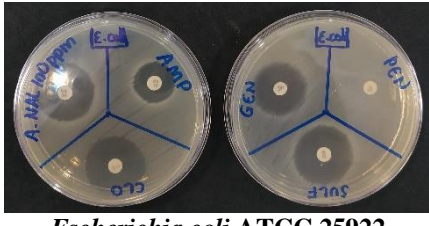
APÊNDICE B

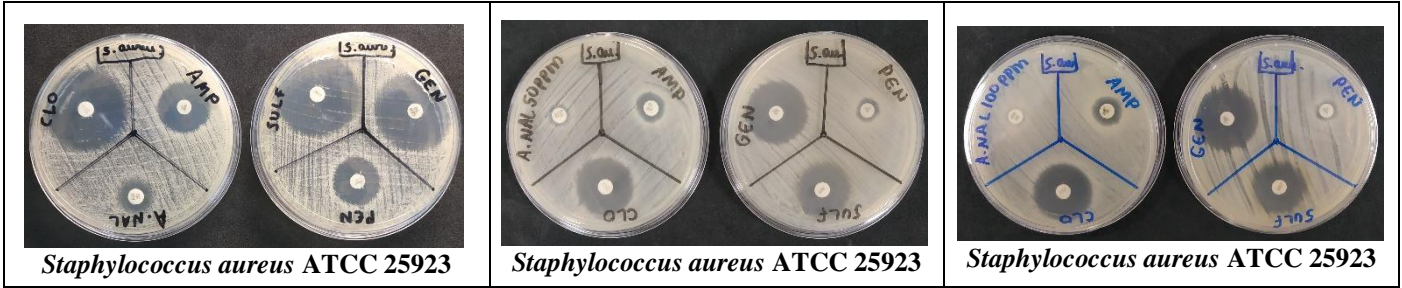
Lista dos equipamentos utilizados e suas respectivas marcas.

| Equipamento | Marca |
|------------------------------------|----------------------|
| Agitador Vórtex VTX – 2500 | Biomixer |
| Autoclave AV75 | Phoenix |
| Balança de precisão TS400S | OHAUS |
| Capela fluxo laminar | Filtracom |
| Espectrofotômetro Biomate 3 UV-VIS | Thermo |
| Estufa para cultura Orion 502 | Fanem |
| Incubadora shaker TE-420 | Tecnal |
| Micropipetas LabMate Pro | LabMate |
| Paquímetro digital | Digimess |
| pHmetro digital HI2210-01 | Hanna Instruments |


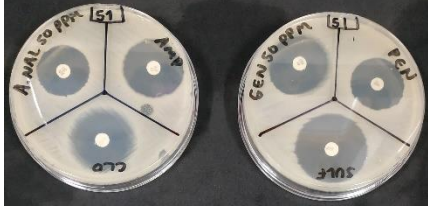
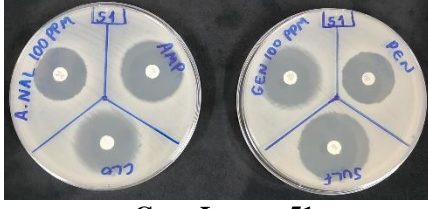
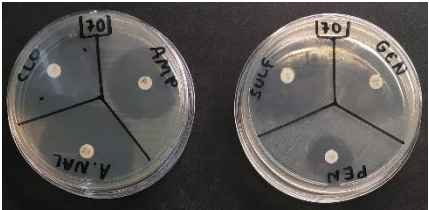
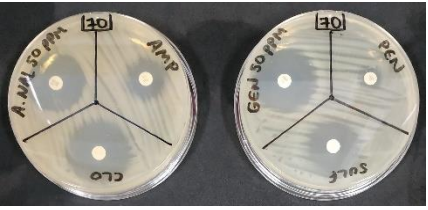





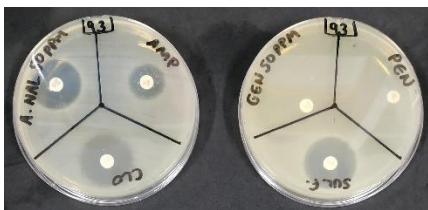
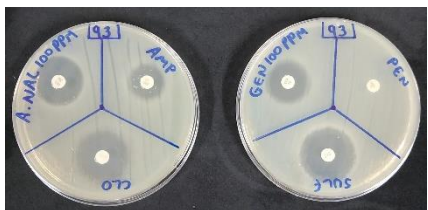


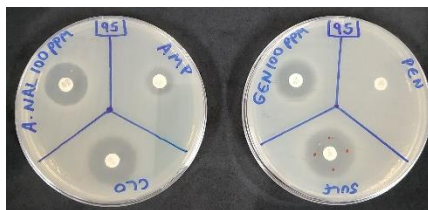
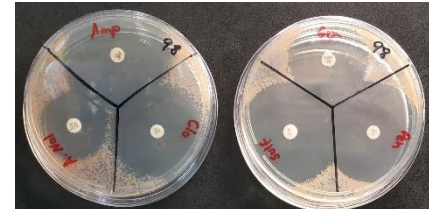


APÊNDICE C
Antibiograma + Atrazina

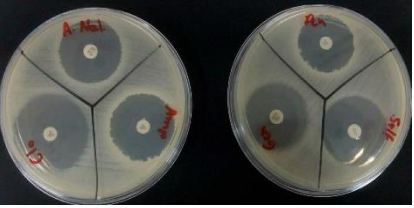

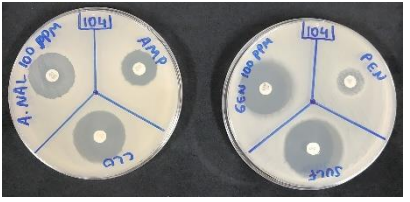

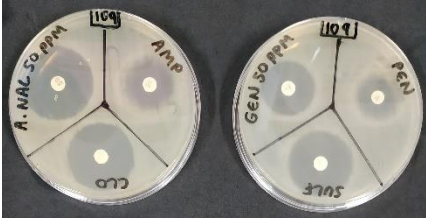
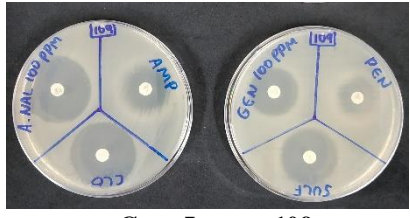
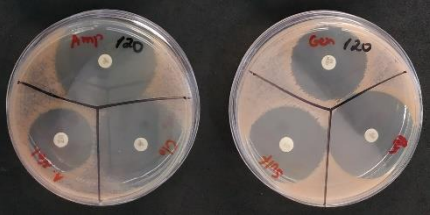

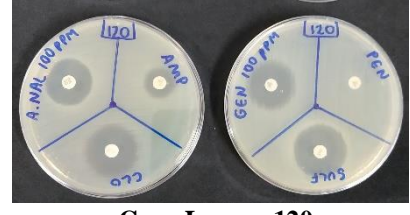


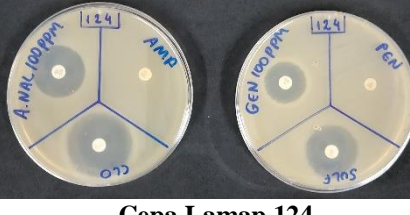

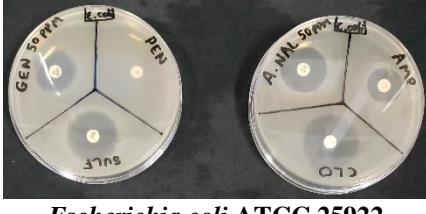
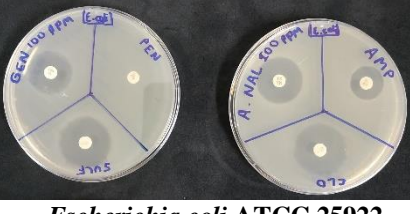
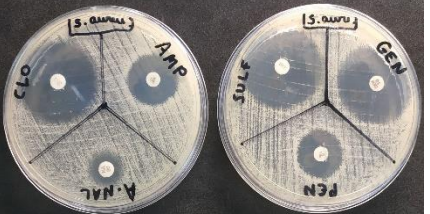


| Sem agrotóxico | Atrazina – 50ppm | Atrazina – 100ppm |
|---|--|---|
|  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 51</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 51</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 51</p> |
|  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 70</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 70</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 70</p> |
|  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 80</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 80</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 80</p> |
|  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 93</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 93</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 93</p> |
|  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 95</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 95</p> |  <p style="text-align: center;">Ceba Lamap 95</p> |

| | | |
|---|--|---|
|  <p>Ceba Lamap 98</p> |  <p>Ceba Lamap 98</p> |  <p>Ceba Lamap 98</p> |
|  <p>Ceba Lamap 104</p> |  <p>Ceba Lamap 104</p> |  <p>Ceba Lamap 104</p> |
|  <p>Ceba Lamap 109</p> |  <p>Ceba Lamap 109</p> |  <p>Ceba Lamap 109</p> |
|  <p>Ceba Lamap 120</p> |  <p>Ceba Lamap 120</p> |  <p>Ceba Lamap 120</p> |
|  <p>Ceba Lamap 124</p> |  <p>Ceba Lamap 124</p> |  <p>Ceba Lamap 124</p> |
|  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |



APÊNDICE D
Antibiograma + Glifosato

| Sem agrotóxico | Glifosato 50ppm | Glifosato 100ppm |
|--|---|--|
|  <p align="center">Ceba Lamap 51</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 51</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 51</p> |
|  <p align="center">Ceba Lamap 70</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 70</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 70</p> |
|  <p align="center">Ceba Lamap 80</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 80</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 80</p> |
|  <p align="center">Ceba Lamap 93</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 93</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 93</p> |
|  <p align="center">Ceba Lamap 95</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 95</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 95</p> |
|  <p align="center">Ceba Lamap 98</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 98</p> |  <p align="center">Ceba Lamap 98</p> |

| | | |
|--|---|--|
|  <p>Ceba Lamap 104</p> |  <p>Ceba Lamap 104</p> |  <p>Ceba Lamap 104</p> |
|  <p>Ceba Lamap 109</p> |  <p>Ceba Lamap 109</p> |  <p>Ceba Lamap 109</p> |
|  <p>Ceba Lamap 120</p> |  <p>Ceba Lamap 120</p> |  <p>Ceba Lamap 120</p> |
|  <p>Ceba Lamap 124</p> |  <p>Ceba Lamap 124</p> |  <p>Ceba Lamap 124</p> |
|  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |  <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> |
|  <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> |  <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> |  <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> |