



**REPÚBLICA
PORTUGUESA**

GABINETE DO SECRETÁRIO DE ESTADO
DOS ASSUNTOS PARLAMENTARES

Exmo. Senhor
Presidente da Comissão de
Ambiente, Ordenamento do Território,
Descentralização, Poder Local e Habitação
Deputado Pedro Soares

SUA REFERÊNCIA
Correio eletrónico

SUA COMUNICAÇÃO DE
16/01/2018

NOSSA REFERÊNCIA
Nº: 464
ENT.: 707
PROC. Nº:

DATA
27/06/2017

ASSUNTO: Pedido de documentação - projeto piloto de investigação sobre Bacia do Ave - Bactérias Multirresistentes

Encarrega-me o Secretário de Estado dos Assuntos Parlamentares de junto enviar, conforme solicitado pelo Gabinete do Senhor Ministro do Ambiente, através do ofício n.º 404, datado de 01 de fevereiro, cuja cópia segue em anexo, a documentação relativa ao assunto mencionado em epígrafe.

Com os melhores cumprimentos,

O Chefe do Gabinete

Nuno Araújo



Exmo. Senhor
Eng.º Nuno Araújo
Chefe do Gabinete do Senhor Secretário
de Estado dos Assuntos Parlamentares
Palácio de São Bento
1249-068 Lisboa

SUA REFERÊNCIA
email

SUA COMUNICAÇÃO DE
16.01.2018

NOSSA REFERÊNCIA

DATA

ASSUNTO: Pedido de Documentação - projeto piloto de investigação sobre bacia do Ave - Baterias Multirresistentes

Caro Nuno Araújo,

Na sequência do email acima identificado e em resposta ao solicitado por esse Gabinete, na sequência do Pedido de documentação, apresentado pelo Senhor Presidente da Comissão de Ambiente, Ordenamento do Território, Descentralização, Poder Local e Habitação da Assembleia da República, encarrega-me o Senhor Ministro do Ambiente de remeter a documentação relativa ao projeto piloto de investigação sobre a bacia do Ave e, ainda, prestar a seguinte informação:

No seguimento da audiência parlamentar de 26 de maio de 2016, onde foi discutido o estudo publicado sobre a deteção de bactérias multirresistentes na bacia hidrográfica do Ave e os potenciais impactos decorrentes para a saúde humana e qualidade ambiental do rio, foi constituído um grupo de trabalho multidisciplinar constituído pela Agência Portuguesa do Ambiente/Administração da Região Hidrográfica do Norte (APA/ARH do Norte) e Águas do Norte (AdN) com o objetivo de estudar esta temática de forma mais exaustiva e abrangente, caracterizando a presença de bactérias multirresistentes na Bacia do Ave.

Nesse âmbito, foi delineado um plano de trabalhos para dar resposta a este compromisso, tendo por base a caracterização dos afluentes rececionados pelas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) inseridas nesta região, no que refere a antibióticos e bactérias resistentes, avaliando-se o desempenho que apresentam quer no tratamento destas substâncias e desinfeção dos efluentes descarregados, quer ao nível da disseminação de resistências microbianas.

Até ao momento, já foram desenvolvidos os seguintes passos:

1. Seleção de locais de estudo

As ETAR selecionadas são: Santo Emilião (Póvoa de Lanhoso), Serzedelo II (Guimarães), Lordelo-Ave (Guimarães) e Ave (Vila do Conde). Pretende-se efetuar a caracterização de afluentes e efluentes de ETAR inseridas na bacia hidrográfica do rio Ave, e de águas superficiais do rio a montante e jusante dos pontos de descarga das respetivas ETAR.



2. Plano de monitorização

Foi definido um plano de monitorização para uma caracterização química e microbiológica e avaliar as concentrações de antibióticos e perfis de resistência microbiana ao longo do processo de tratamento da ETAR, assim como a montante e a jusante dos pontos de descarga das ETAR no rio.

Está em curso o processo de celebração do protocolo de cooperação entre a APA/ARH Norte e a AdNorte para o desenvolvimento dos estudos de caracterização, deteção e eventual eficiência do tratamento face à presença de bactérias multirresistentes no meio hídrico.

Esta proposta de estudo e respetiva metodologia surge na sequência do “Levantamento Prévio” dos trabalhos efetuados nas bacias hidrográficas do norte, visando aprofundar o conhecimento sobre a matéria (em anexo).

Este “levantamento Prévio” evidenciou que algumas bactérias apresentam resistência a alguns antibióticos, e que um dos focos de contaminação das águas por antibióticos tem origem nas atividades de pecuária cujo consumo de antibióticos é cerca do dobro do consumo humano.

O “Levantamento Prévio” faz um resumo dos trabalhos conhecidos sobre a matéria e propõe a elaboração de um “Estudo” compreendendo os seguintes objetivos e tarefas:

- I. Caracterizar a presença de antibióticos e BMR nos efluentes de ETAR inseridas na bacia hidrográfica do Ave, e nos pontos de descarga a montante e jusante destas infraestruturas;
- II. Caracterizar a eficiência de tratamento de antibióticos e grau de desinfecção das ETAR selecionadas para este estudo, e o impacto decorrente da descarga destas infraestruturas no meio hídrico recetor;
- III. Avaliar os perfis de resistência microbiana existentes nas águas superficiais e residuais (domésticas e hospitalar);
- IV. Identificar potenciais focos de contaminação mais relevante de antibióticos e/ou bactérias resistentes nesta bacia;
- V. Levantamento do desempenho de processos unitários convencionais de ETAR no tratamento de poluentes emergentes (PE), e de tecnologias alternativas dedicadas a este tratamento específico, que permitirá contextualizar resultados;
- VI. Propor recomendações e/ou ações que permitam minimizar eventuais impactos identificados.

Tarefas:

1. Realização de 4 campanhas de amostragem ao longo de 1 ano, com recolha de amostras de água superficial no rio a montante e jusante de descargas de ETAR, ao longo do processo de tratamento das ETAR, e efluente hospitalar, para:
 - a. Análise de parâmetros físico-químicos das amostras de água recolhidas, incluindo a análise a antibióticos por LC-MS/MS;
 - b. Análise de perfis de resistência bacteriana presentes nas amostras recolhidas, com pesquisa de bactérias resistentes a antibióticos selecionados;



2. Levantamento do desempenho de processos unitários convencionais de ETAR no tratamento de PE, e de tecnologias alternativas direcionadas para tratamento de PE e desinfecção de efluentes;
3. Definição de recomendações e/ou ações para mitigar impactos identificados decorrentes da análise dos resultados.

Serão processadas um total de 84 amostras ao longo do estudo que terá a duração de 24 meses.

Este estudo será levado a cabo pela AdNorte e APA, com a Universidade Católica do Porto e o Instituto Superior de Engenharia do Porto e a Universidade do Minho.

Em paralelo, dando prossecução ao determinado pela União Europeia (UE) foi estabelecido o mecanismo da lista de vigilância ("watch list"). Esta lista é definida pela Comissão Europeia com a finalidade de monitorizar de forma dirigida as substâncias incluídas e aumentar o conhecimento acerca da ocorrência dessas substâncias ou grupo de substâncias, nas águas superficiais da UE, como base para futuros exercícios de priorização de substâncias prioritárias. Nesse sentido, a APA, está, desde 2016, a implementar o projeto "Desenvolvimento e implementação de métodos inovadores na avaliação de substâncias prioritárias, de substâncias da lista de vigilância e de compostos emergentes nas massas de água e de substâncias prioritárias no biota para a melhoria da avaliação do estado químico".

Este projeto, financiado pelo PO SEUR, contempla a realização de pesquisas abrangentes de contaminantes, nomeadamente de compostos emergentes (por ex. pesticidas e substâncias farmacêuticas) em águas superficiais e subterrâneas recorrendo à instalação de amostradores passivos e à análise qualitativa ("screening"). Realça-se que, a amostragem passiva é uma metodologia ainda pouco difundida (quando comparada com a amostragem instantânea) e quando associada a métodos analíticos de ponta, permite pesquisar e identificar inequivocamente uma gama alargada de contaminantes.

Na Região Norte foram identificados quatro locais para a realização desta amostragem, estando um dos pontos localizados na bacia do Ave, mais concretamente a jusante da ETAR de Rabada, em Santo Tirso. De referir que este equipamento foi vandalizado, o que comprometeu os resultados desta amostragem.

Com os melhores cumprimentos, *também os meus*

A Chefe do Gabinete

Ana Cisa

CG/SI



LEVANTAMENTO SOBRE A PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS E BACTÉRIAS RESISTENTES NAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO NORTE DE PORTUGAL

ÁGUAS DO NORTE

13 de Dezembro de 2016

www.wedotech.eu
info@wedotech.eu
Tel: 225 093 124

1. SUMÁRIO

No seguimento da publicação de um trabalho científico que identificou bactérias multirresistentes no rio Ave, foi conduzido o presente levantamento para reunir informação existente sobre a contaminação dos recursos hídricos na região Norte por antibióticos e bactérias resistentes. Pretende-se com este levantamento caracterizar os estudos efetuados nestas áreas e nas bacias limítrofes por forma a permitir contextualizar os resultados do referido estudo e discutir um plano de trabalhos para dar resposta ao mediatismo causado pelo estudo.

2. ÍNDICE

1.	SUMÁRIO	2
2.	ÍNDICE	3
3.	ABREVIATURAS	4
4.	ÍNDICE DE TABELAS.....	5
5.	ÍNDICE DE FIGURAS	6
6.	INTRODUÇÃO.....	7
7.	METODOLOGIA.....	12
8.	ESTUDOS ANALISADOS	13
8.1	PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS NO DOMÍNIO HÍDRICO	13
8.1.1	Estudos em águas superficiais.....	13
8.1.2	Estudos em águas residuais e hospitalares	18
8.2	RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS A ANTIBIÓTICOS	29
8.2.1	Estudos realizados no Rio Ave.....	29
8.2.2	Estudos em águas superficiais.....	34
8.2.3	Estudos em águas residuais e hospitalares	36
9.	CONSIDERAÇÕES	43
10.	REFERÊNCIAS	45
11.	ANEXOS.....	48

3. ABREVIATURAS

AMP	Ampicilina
AMX	Amoxicilina
AZT	Azitromicina
CFT	Ceftazina
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CLD	Clindamicina
CLF	Cloranfenicol
CLI	Clidamicina
CLM	Claritromicina
DXC	Doxiciclina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ENRO	Enrofloxacin
ERT	Eritromicina
EST	Estreptomicina
ETA	Estação de tratamento de água
ETAR	Estação de Tratamento de água residual
GCR	Genes conferentes de resistência
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MDR	Multirresistente
MET	Meticilina
MRP	Meropenem
MS	Espectrometria de massa
NFX	Norfloxacina
NTF	Nitrofurantoina
OFX	Ofloxacina
OXA	Oxacilina
OXT	Ofloxacina
PDR	Pan-resistente
PIN	Pinicilina
Q/D	Quinupristin-dalfopristim
RIF	Rifampicina
SFD	Sulfadiazina
SFM	sulfametazina
SFP	Sulfapiridina
SFX	Sulfametoxazol
STZ	Sulfatiazol
SXT	Sulfametoxazole-trimetoprim
TCP	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TMP	Trimetroprima
TRM	trimetoprim
VAN	Vancomicina
XDR	Extremamente-resistente

4. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do estudo Watch List (APA, 2012).	14
Tabela 2. Resumo das concentrações de antibióticos detetados em 6 ETARs no norte na primavera e verão (Pereira, et al., 2015).	19
Tabela 3. Quantificação de antibióticos presentes em efluente hospitalar e respetiva ETAR urbana (Varela, et al., 2014).	20
Tabela 4. Quantificação de antibióticos presentes no afluente e efluente da ETAR de Parada (Figueiredo, 2012).	21
Tabela 5. Resumo das concentrações de antibióticos em amostras de água reportadas nos estudos analisados.	24
Tabela 6. Descrição da localização dos pontos de amostragem no rio Ave (Vasconcelos, 2015).	30
Tabela 7. Resumo da prevalência de resistências a antibióticos (%) reportadas nos estudos analisadas	40
Tabela 8. Classes de Antibióticos	48

5. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronologia da descoberta de classes de antibióticos (reproduzido de (Fischbach & Walsh, 2009)).	7
Figura 2. Percentagem anual de isolados invasivos não suscetíveis e resistentes em Portugal 2003-2014 (DGS, 2016).	8
Figura 3. Vias de introdução de fármacos no ciclo urbano da água (reproduzido de (Gaffney, et al., 2016)).	10
Figura 4. Consumo total de antibióticos em Portugal entre 2010- 2011 (Almeida, et al., 2014). Legenda: consumo humano – amarelo; consumo veterinário – verde; consumo total – púrpura.	11
Figura 5. Resultados da concentração de sulfametoxazol (ng/L) em bacias selecionadas a jusante de ETARs, (esquerda) e o respetivo consumo em ton (direita); (reproduzido de (APA, 2015)).	14
Figura 6. Localização dos locais de amostragem o longo do rio Douro (Madureira, et al., 2010).	16
Figura 7. Distribuição da concentração do antibiótico sulfametoxazol (SMX) ao longo do rio Douro (Madureira, et al., 2010).	16
Figura 8. Concentrações máximas encontradas nos pontos de captação de água da EPAL (reproduzido de (Gaffney, et al., 2015)).	18
Figura 9. Localização das ETARs da zona norte incluídas no estudo avaliado (reproduzido de (Pereira, et al., 2015)).	19
Figura 10. Concentrações de antibióticos detetados no rio Lis e afluentes e efluentes de duas ETARs (Paíga, et al., 2016).	22
Figura 11. Localização dos pontos de amostragem onde foram realizadas as recolhas de amostras (Vasconcelos, 2015).	30
Figura 12. Exemplo de antibiogramas por difusão em disco realizados com isolados de <i>E. coli</i> .	31
Figura 13. Distribuição do número de isolados de <i>E. coli</i> MDR identificados nos 6 locais (A a F) e nas diferentes campanhas de recolha (R1 a R4); (Vasconcelos, 2015).	32
Figura 14. Distribuição do número de isolados de <i>Enterococcus spp.</i> MDR identificados nos 6 locais (A a F) e nas diferentes campanhas de recolha (R1 a R4); (Vasconcelos, 2015).	32
Figura 15. Percentagem de resistência a antibióticos em bactérias isoladas do rio Ferreira e rio Douro (Reproduzido de (Narciso-da-Rocha, et al., 2015)).	35
Figura 16. Prevalência da resistência aos antibióticos nas águas residuais durante o período de monitorização (Varela, et al., 2014).	37
Figura 17. Percentagem de resistência reportada para diferentes antibióticos em <i>Enterococcus spp.</i> isolados em ETARs nacionais (Martins da Costa, et al., 2006).	38
Figura 18. Prevalência de resistência a antibióticos de bactérias isoladas no afluente e efluente de ETAR.	39

6. INTRODUÇÃO

Desde 1938, com a descoberta da penicilina, que os antibióticos vieram revolucionar a medicina com a sua capacidade de tratamento de infeções bacterianas. Desde então, foram identificadas diversas classes de antibióticos, com agentes de princípio ativo semelhante, direcionadas para o tratamento de inúmeras infeções provocadas por diferentes estirpes bacterianas. Apresenta-se em anexo a Tabela 8 com a identificação das principais classes de antibióticos, respetivos agentes e mecanismo de ação.

Devido à inata capacidade de adaptação das bactérias a agentes antimicrobianos, a procura de novos agentes é uma constante. Contudo, verifica-se atualmente que os níveis de resistência a antibióticos estão a aumentar, enquanto o progresso da descoberta de novos agentes tem sido lento e não tem acompanhado esta tendência com a introdução de novas substâncias ativas (Figura 1) (Fischbach & Walsh, 2009). Neste enquadramento, a ocorrência de resistência a antibióticos representa uma séria ameaça para a saúde pública, que requiere uma ação concertada entre todos os setores governamentais e da sociedade (OMS, 2016).

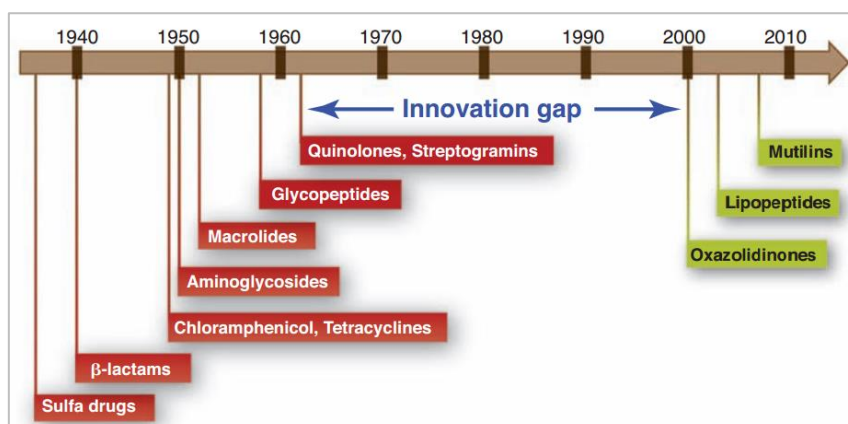


Figura 1. Cronologia da descoberta de classes de antibióticos (reproduzido de (Fischbach & Walsh, 2009)).

A resistência a antibióticos é um processo que ocorre naturalmente, contudo a utilização inadequada ou irresponsável de antibióticos tem atualmente acelerado este processo (OMS, 2016; Loureiro, et al., 2016). Estas bactérias resistentes podem ser encontradas em ambientes hospitalares, alimentos, pessoas, animais e em amostras ambientais, como solos ou cursos de água.

Em Portugal, os perfis de resistência a antibióticos das estirpes bacterianas associadas a infeções registadas pelos serviços de saúde são monitorizados ao abrigo do Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (DGS, 2016). Apresenta-se na Figura 2 a evolução nacional da percentagem de resistência identificada para cada grupo de infeções bacterianas registadas. Verifica-se que para o género *Escherichia coli* (*E. coli*) a resistência à

classe de antibiótico carbapenemos é ainda insignificante ao nível das infeções clínicas (< 1%). Destaca-se que no estudo que caracterizou os perfis de resistência de *E. coli* no rio Ave foi isolada uma bactéria que apresentava resistência a um antibiótico desta classe, o imipenem (Vasconcelos, 2015). Relativamente ao género *Enterococcus spp.*, verifica-se que a resistência à vancomicina tem vindo a reduzir ao nível das infeções por este género (< 1% *E. faecalis* e < 20% *E. faecium*), e que este é o antibiótico mais eficaz no tratamento de infeções por este género. Esta foi uma das resistências também identificadas para *Enterococcus spp.* no mesmo estudo realizado no rio Ave.

MICROORGANISMO POR GRUPO ANTIMICROBIANO	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Streptococcus pneumoniae</i>												
Penicilina R	<1	<1	<1	<1	<1	<1	18	15	8	5	4	5
Penicilina RI	20	27	17	17	16	18	18	15	10	8	8	10
Macrolidos RI	-	20	19	21	23	22	22	22	15	19	21	16
<i>Staphylococcus aureus</i>												
Oxacilina/meticilina R	45	46	47	48	48	53	49	53	55	54	47	47
<i>Escherichia coli</i>												
Aminopenicilinas R	53	58	58	59	59	58	58	56	57	59	59	59
Aminoglicosídeos R	9	13	12	12	12	14	11	12	16	16	16	16
Fluoroquinolonas R	26	27	29	28	30	29	28	27	27	30	32	32
Cefalosporinas 3ª geração R	7	8	12	10	10	10	9	10	11	14	15	16
Carbapenemos R	-	-	-	-	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Enterococcus faecalis</i>												
Aminopenicilinas RI	4	5	<1	2	4	4	7	17	24	12	8	2
Gentamicina HL R	34	29	38	41	41	43	34	39	30	43	37	33
Vancomicina R	3	6	5	5	4	4	4	2	4	3	3	1
<i>Enterococcus faecium</i>												
Aminopenicilina RI	88	83	92	76	93	86	91	91	81	94	90	88
Gentamicina HL R	55	66	68	53	49	28	49	53	38	58	36	35
Vancomicina R	47	42	34	26	29	24	23	23	20	23	22	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>												
Aminoglicosídeos R	-	-	<1	13	11	19	20	27	32	32	30	31
Fluoroquinolonas R	-	-	<1	20	18	22	28	31	36	36	36	37
Cefalosporinas 3ª geração R	-	-	-	21	17	26	28	28	35	39	37	41
Carbapenemos R	-	-	-	-	<1	<1	<1	1	<1	<1	2	2

Figura 2. Percentagem anual de isolados invasivos não suscetíveis e resistentes em Portugal 2003-2014 (DGS, 2016).

No ambiente os contaminantes resistentes, que têm a capacidade de persistir e/ou proliferar, englobam não só as bactérias resistentes mas também os genes que conferem resistência, que podem existir dentro das bactérias ou de forma independente como elementos genéticos “livres” (ex. plamídeos ou integrões), que podem ser assimilados por outras bactérias

(Berendonk, et al., 2015). Salienta-se assim que a dispersão destes genes conferentes de resistência (GCR) no ambiente representam também um risco pelo seu potencial de “criação” de bactérias resistentes.

Existem 3 mecanismos de disseminação de resistência a antibióticos, que podem ocorrer em combinação (Berendonk, et al., 2015; Varela, et al., 2014):

- Transferência horizontal de genes, em que a informação genética que confere resistência é transferida entre bactérias por contacto (frequente em ambientes com elevada densidade microbiana);
- Mutação e recombinação genética, que é um processo evolutivo natural que consiste em alterações aleatórias na informação genética das bactérias que podem resultar em mecanismos de resistência;
- Proliferação de bactérias resistentes devido a pressão seletiva causada pela exposição continuada a agentes antimicrobianos, como antibióticos, biocidas e metais pesados.

Um microrganismo classifica-se como multirresistente (MDR) se este não for suscetível a agentes antimicrobianos de um mínimo de 3 classes de antibióticos (pelo menos 1 agente por classe). Existem duas classes de resistência adicionais, designadas por Extremamente Resistente (XDR), que são apenas suscetíveis a pelo menos 1 agente de 2 classes de antibióticos), e por Pan-Resistente (PDR), que não é suscetível a nenhum agente de todas as classes (Magiorakos, et al., 2012). Destaca-se que no estudo realizado no rio Ave, foram identificados dois isolados de *E. coli* que apresentavam um perfil de resistência XDR e PDR (Vasconcelos, 2015).

Os locais que proporcionam o desenvolvimento ou transferência de resistência, considerados como *hotspots* de resistência antimicrobiana, são caracterizados por terem elevadas cargas microbianas, concentrações sub-terapêuticas de antibióticos e por contribuírem para descargas de bactérias resistentes e GCR para o ambiente (Berendonk, et al., 2015). Estes *hotspots* incluem:

- Ambientes hospitalares / clínicos
- ETARs
- Efluentes de indústria farmacêutica
- Pecuárias e instalações de aquacultura.

Com a utilização generalizada de antibióticos na medicina humana e veterinária, a contaminação ambiental por estas substâncias é também cada vez mais extensa, em particular no meio aquático (Figura 3). Vários estudos têm documentado a deteção e quantificação destas substâncias no meio hídrico, onde se incluem águas subterrâneas, superficiais (rios e lagos), em estações de tratamento de água para consumo e residuais (ETAs e ETARs), e até em águas de consumo (Correia, 2014; Figueira, et al., 2011; Gaffney, et al., 2015).

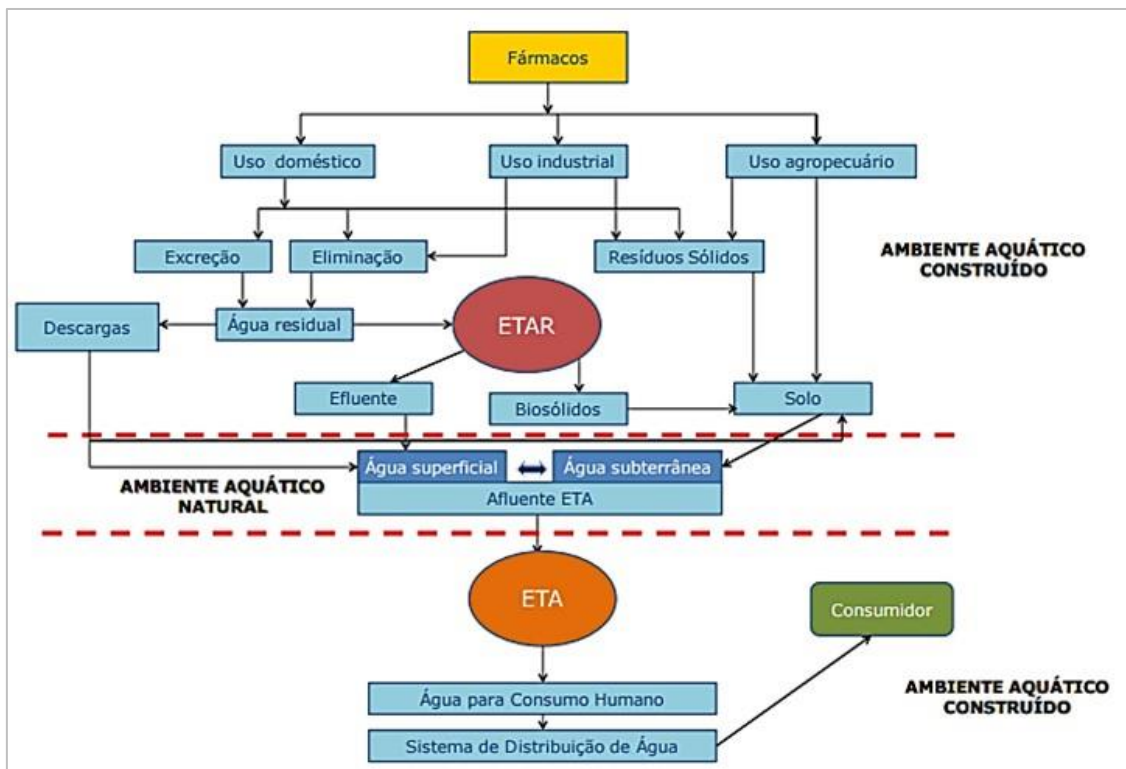


Figura 3. Vias de introdução de fármacos no ciclo urbano da água (reproduzido de (Gaffney, et al., 2016)).

No grupo dos 30 países da EU, Portugal ocupava em 2014 a 16ª posição no que respeita ao consumo de antibióticos na comunidade (fora de ambiente hospital), e situava-se ligeiramente abaixo da média Europeia (DGS, 2016). As quatro classes de antibióticos mais consumidas em Portugal são penicilinas (β -lactâmicos), tetraciclina, macrólidos e quinolonas. A maioria deste consumo ocorre na comunidade (consumo doméstico), e uma parte reduzida em ambiente hospitalar, que está geralmente associado ao consumo de antibióticos de mais largo espectro. O consumo total de antibióticos para saúde humana em Portugal foi de 86 toneladas em 2011, enquanto o consumo total para fins veterinários foi de 162 toneladas (Figura 4), correspondente ao dobro do consumo humano (Almeida, et al., 2014). Assim, para além dos efluentes domésticos e hospitalares, os efluentes e excreções de origem pecuária/aquacultura têm também um impacto significativo na contaminação dos solos e cursos de água com estas substâncias.

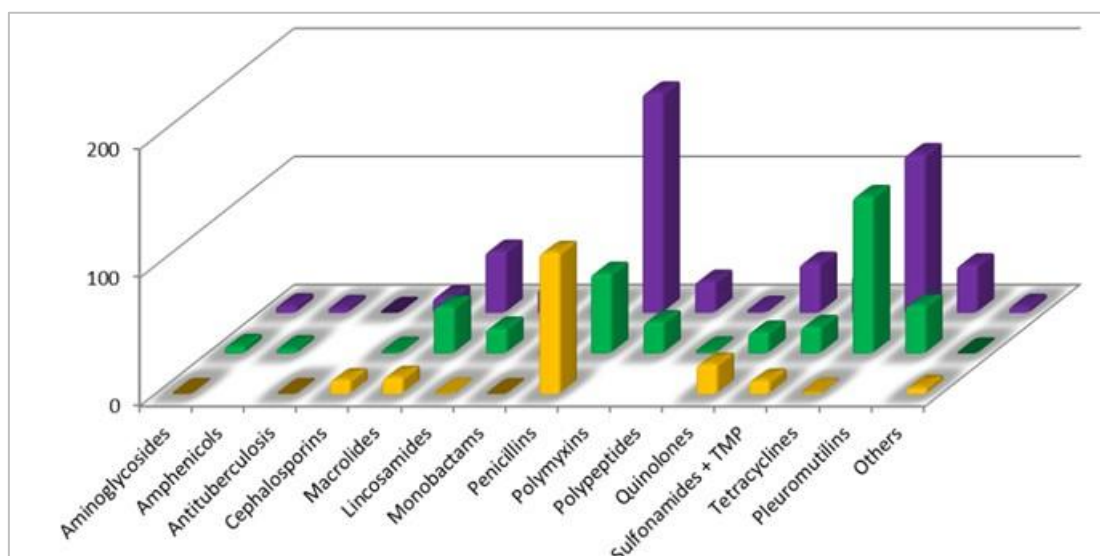


Figura 4. Consumo total de antibióticos em Portugal entre 2010- 2011 (Almeida, et al., 2014).
Legenda: consumo humano – amarelo; consumo veterinário – verde; consumo total – púrpura.

Embora não exista legislação específica para antibióticos e outros fármacos, foi criada uma lista de vigilância de substâncias para monitorização no domínio da água a nível da União Europeia, que identifica um conjunto de 10 substâncias, ou grupos de substâncias, para os quais devem ser recolhidos dados de monitorização que servirão de base a avaliações de risco para identificar substâncias que representem um risco significativo, que poderão ser incluídas na lista de substâncias prioritárias em revisões futuras (EU, 2015; Barbosa, et al., 2016). Atualmente, nesta lista de vigilância está incluída a família de antibióticos macrolídeos onde se incluem a eritromicina (ERI), claritromicina (CLM) e azitromicina (AZT). O método analítico de referência indicado para a quantificação destes antibióticos consiste na extração em fase sólida e análise por cromatografia em fase líquida com espetrometria de massa de triplo quadripolo (SPE – LC-MS-MS), com um limite de deteção máximo aceitável de 90 ng/L.

Embora já estejam a ser dados passos ao nível da monitorização da contaminação dos recursos hídricos por antibióticos, ainda existe pouca organização ao nível da monitorização e controlo da contaminação ambiental por bactérias resistentes, e dos riscos que esta pode representar para a saúde humana.

No seguimento da publicação de um trabalho científico que identificou bactérias multirresistentes no rio Ave, foi conduzido o presente levantamento para reunir informação existente sobre a contaminação dos recursos hídricos na região Norte por antibióticos e bactérias resistentes. Pretende-se com este levantamento caracterizar os estudos efetuados nestas áreas e nas bacias limítrofes por forma a permitir discutir um plano de trabalhos para dar resposta ao mediatismo causado pelo estudo.

7. METODOLOGIA

Os recursos consultados para a realização deste levantamento incluíram:

- Dissertações e teses académicas nacionais;
- Artigos científicos publicados em revistas internacionais e nacionais com revisão científica (*peer-reviewed*);
- Estudos e resultados de monitorizações disponibilizados pela Águas do Norte e Agência Portuguesa do Ambiente;
- Relatórios publicados pela Direção Geral de Saúde;
- Regulamentos e Decisões da União Europeia;
- Apresentações de projetos de I&D publicados na internet.

O estudo engloba investigação realizada desde o ano 2000 até ao presente sobre esta temática, desenvolvida principalmente em Portugal. O levantamento foi direcionado para estudos realizados na bacia hidrográfica do norte, contudo, quando relevante, foram incluídos estudos realizados sobre outras bacias para referência.

8. ESTUDOS ANALISADOS

Nesta secção são apresentados os resultados do levantamento realizado. O levantamento foi dividido em duas subsecções principais, onde se incluem os estudos realizados sobre a deteção e quantificação de antibióticos em águas, e estudos realizados para caracterização de microrganismos resistentes a antibióticos.

8.1 PRESENÇA DE ANTIBIÓTICOS NO DOMÍNIO HÍDRICO

Foi realizado um levantamento de estudos, teses e artigos científicos que apresentam dados quantitativos referentes à presença de antibióticos no domínio hídrico. Estes estudos debruçam-se sobre diversas tipologias de águas: águas superficiais, águas residuais (domésticos e hospitalares), águas subterrâneas e de consumo.

Em função da relevância dos estudos analisados para este levantamento, são apresentados resumos detalhando os principais resultados. Esta avaliação foi ainda dividida em estudos realizados sobre águas superficiais e residuais, embora alguns estudos integrem ambas as tipologias de águas. Apresenta-se no final desta secção na Tabela 5 a compilação das concentrações de antibióticos referenciados nos estudos analisados, que incluem os estudos resumidos e outros que foram identificados.

8.1.1 Estudos em águas superficiais

Um estudo realizado pela Águas do Noroeste entre 2009 e 2011, pesquisou a presença de poluentes emergentes no Baixo Cávado para avaliar o seu impacto na qualidade das águas captadas na ETA de Areias de Vilar (Martins, 2012). Foram realizadas campanhas de amostragem trimestrais (10 campanhas), com recolhas de água superficial em 5 locais considerados estratégicos:

- Local 1: Ponte do Bico;
- Local 2: Ribeira de Panóias;
- Local 3: Padim da Graça;
- Local 4: Captação de Areias de Vilar;
- Local 5: Barca do Lago.

Neste estudo, entre um conjunto alargado de vários fármacos, foram pesquisados os antibióticos azitromicina (AZT) e ciprofloxacina (CIP). A AZT foi detetada nos locais 2 e 3 (num total de 10 determinações) com uma concentração máxima de 524 ng/L. A CIP foi detetada nos locais 1, 2 e 3 (num total de 7 determinações) com uma concentração máxima de 500 ng/L. Salienta-se que o local 2 foi o ponto onde foi detetada maior diversidade de substâncias e onde estavam presentes em maior concentração. Os poluentes emergentes monitorizados, onde se destacam os fármacos, apresentam expressão significativa, tendo sido identificada uma relação direta da sua frequência e quantidade, nos locais mais afetados pelas principais fontes de poluição (descargas de ETAR).

Em 2012 a APA conduziu um estudo piloto (Watch List 2012) para caracterizar a presença de fármacos em águas superficiais em território nacional (APA, 2012). No âmbito deste estudo foi analisada a presença de sulfametoxazol (SFX) na zona norte, tendo-se encontrado concentrações entre 2.2 e 11.5 ng/L (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do estudo Watch List (APA, 2012).

Local Amostragem	Data	Sulfametoxazole (SFX) (ng/L)
Penide, Areias de Vilar	29.8.2012	11,5
Barca d'Alva	30.8.2012	2,2
Albufeira Crestuma	29.8.2012	8,9
Ponte Formoselha	29.8.2012	30,8
Perais	30.8.2012	13,5
Valada_Tejo	29.8.2012	13,3
Alb. Roxo	31.8.2012	<0,13
Monte da Vinha	31.8.2012	8,6
	LQ	0,13 ng/L

Um poster apresentado pela APA em 2015, apresentou uma comparação entre os níveis de 4 fármacos presentes em águas superficiais de várias bacias hidrográficas (APA, 2015). Neste estudo o antibiótico SFX foi analisado em pontos de amostragem a jusante de ETARs municipais, tendo-se verificado que a zona do Porto era a mais contaminada por este antibiótico (Figura 5). Destaca-se que esta ocorrência estava correlacionada com os dados de consumo de SFX no distrito do Porto, tendo-se verificado a mesma tendência para os outros fármacos analisados.

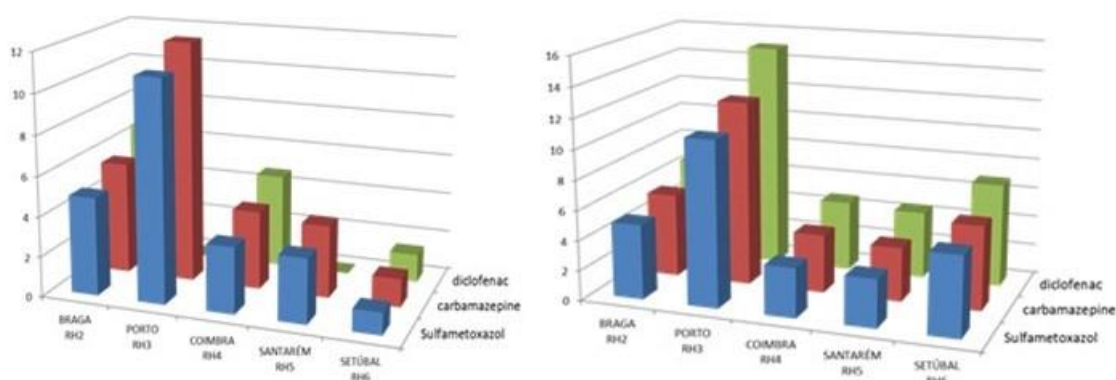


Figura 5. Resultados da concentração de sulfametoxazol (ng/L) em bacias selecionadas a jusante de ETARs, (esquerda) e o respetivo consumo em ton (direita); (reproduzido de (APA, 2015)).

Outro estudo conduzido pela Águas Douro e Paiva quantificou entre Maio 2009 e Março 2010 a presença de antibióticos nas águas de origem utilizadas para produção de águas de consumo (AdDP, 2010). Os locais de amostragem foram os seguintes: rio Douro, poço de Lever-Montante,

rio Paiva, água bruta da ETA de Ferro e rio Ferreira. A quantificação analítica dos antibióticos foi subcontratada (laboratório Sagilab) e incluiu a monitorização de 40 antibióticos pertencentes a mais de 6 classes. Em todas as amostras analisadas os resultados foram inferiores aos limites de deteção para cada antibiótico, pelo que a AdDP concluiu que o risco destes compostos estarem presentes na água tratada distribuída, em níveis da ordem dos $\mu\text{g/L}$, é muito diminuto. Contudo, importa salientar que os limites de deteção (LD) da metodologia analítica aplicada (não especificada) variavam entre 4 000 e 200 000 ng/L , e que estão numa gama muito superior ao LD máximo indicado na lista de vigilância da EU para antibióticos da classe macrolídeos (90 ng/L), e que corresponde também a uma gama de quantificação muito superior aos resultados reportados nos outros estudos compilados neste documento (como no estudo referido no parágrafo anterior para AZT e CIP com concentrações na ordem dos 500 ng/L).

Um estudo realizado sobre a qualidade da água do rio Douro avaliou a contaminação por fármacos (pertencentes a seis classes diferentes) ao longo do rio durante um ano (Madureira, et al., 2010). As amostras de água foram recolhidas em 11 pontos desde a barragem de Crestuma-Lever até à foz do rio (Figura 6). As recolhas foram realizadas entre Outubro 2007 e Julho 2008, em 4 períodos do ano (diferentes estações), e em períodos de maré baixa e maré alta. Todas as amostras foram recolhidas a meio do estuário, com a exceção dos pontos 2, 4, 8 e 10, onde foram recolhidas nas margens. No total foram processadas 87 amostras de águas do rio, correspondentes a 2 amostras por ponto em cada estação do ano, uma recolhida em maré alta e outra em maré baixa. Foi apenas monitorizada a contaminação por um antibiótico, SFX, que foi detetado numa gama de concentrações entre 8 a 52.5 ng/L . A análise espaço-temporal mostrou que a concentração é significativamente superior nos pontos de amostragem mais perto da foz (Figura 7), sendo que foi no ponto 2 onde se verificaram as concentrações mais elevadas (após a ETAR de Sobreiras). Não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes entre o efeito da maré ou estação do ano para este fármaco, embora tenham sido encontradas concentrações superiores no inverno.

Num estudo subsequente, os autores avaliaram o impacto dos fármacos detetados no rio Douro, nas mesmas concentrações em foram quantificados, no desenvolvimento de embriões de peixe zebra (Madureira, et al., 2011). Os resultados mostram que esta mistura de fármacos, onde se incluiu o antibiótico SFX, induziu alterações genéticas, como redução do tamanho da cauda e batimento cardíaco, demonstrando que concentrações destes fármacos ao nível das ng/L podem introduzir alterações nas espécies marinhas.

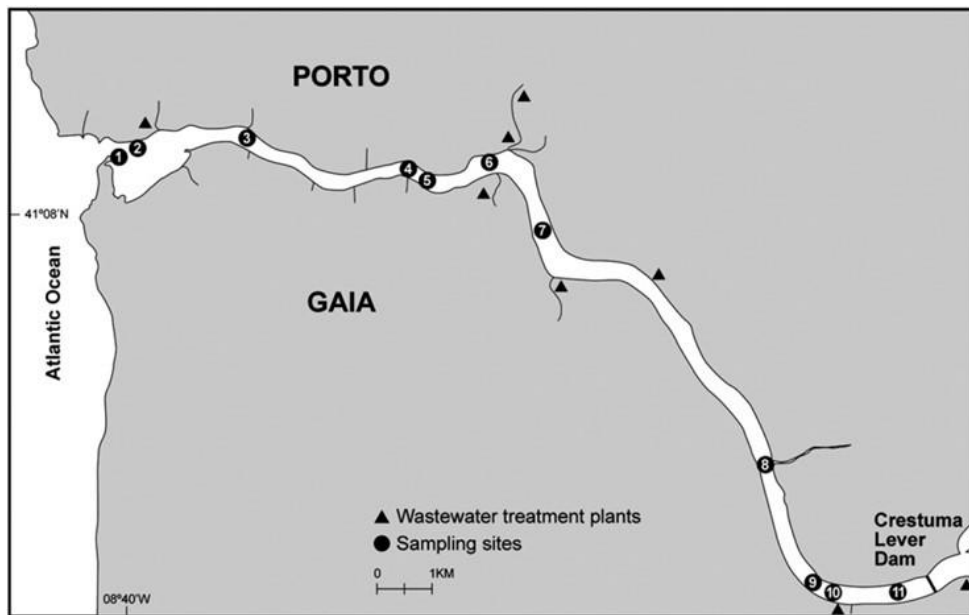


Figura 6. Localização dos locais de amostragem o longo do rio Douro (Madureira, et al., 2010).

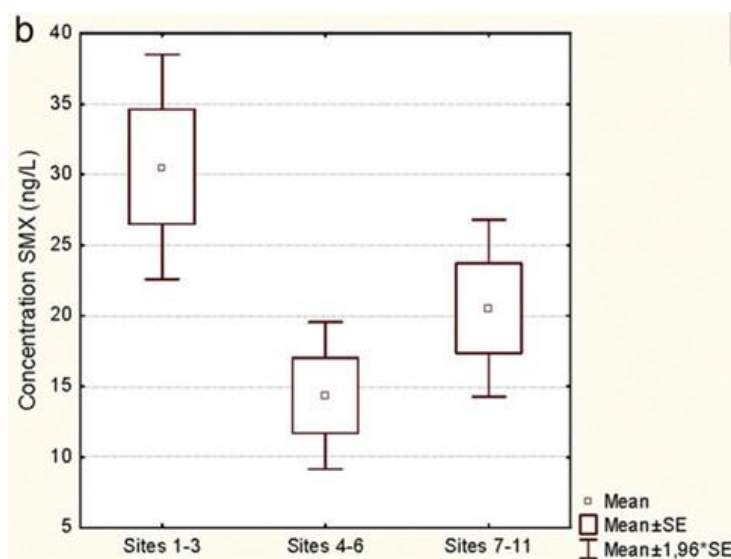


Figura 7. Distribuição da concentração do antibiótico sulfametoxazol (SMX) ao longo do rio Douro (Madureira, et al., 2010).

Num estudo realizado sobre a quantificação de um conjunto de 23 fármacos presentes em duas ETARs inseridas na Bacia do Douro, foi avaliada a presença dos antibióticos AZT e CIP no afluente e efluente destas ETARs (Sousa, et al., 2011a). As concentrações de AZT no afluente das ETARs avaliadas eram idênticas com valores de 571 e 617 ng/L, para a ETAR 1 (ETAR de Febros) e 2 respetivamente, e no efluente as concentrações eram de 617 e 836 ng/L. As concentrações de CIP foram inferiores a 6 ng/L nos afluentes e efluentes de ambas as ETARs. O facto de se terem quantificado concentrações de AZT superiores à saída das ETARs foi explicado pela amostragem ser pontual e a saída não corresponder ao tratamento da amostra que está a entrar na ETAR

nesse momento. É também referido que alguns metabolitos de certos fármacos se podem conjugar nas substâncias iniciais. No entanto, o valor de AZT detetado no efluente da ETAR sugere que a eficiência de tratamento deste fármaco na ETAR é reduzida.

Para enquadrar o impacto destas descargas no rio Febros, foi avaliada numa investigação subsequente a concentração destes antibióticos em amostras de águas superficiais do rio nos pontos a montante e a jusante da ETAR de Febros (Sousa, et al., 2011b). A montante da ETAR não foi detetada AZT, mas a jusante o valor monitorizado foi de 150 ng/L, o que sugere que o efluente da ETAR poderá estar a contribuir para a contaminação do rio Febros com este fármaco.

Para comparação, incluiu-se nesta análise um estudo realizado na bacia do rio Tejo com a participação da EPAL, que quantificou a presença de antibióticos, entre outros fármacos, em mais de 250 amostras de água recolhidas ao longo do circuito de captação no rio, tratamento e rede de distribuição de água (Gaffney, et al., 2014; Gaffney, et al., 2015). Os antibióticos monitorizados foram: eritromicina (ERT), SFX, sulfadiazina (SFD), sulfapiridina (SFP) e sulfametazina (SFM). As concentrações máximas de ERT na água superficial foram de 32 ng/L para o rio Tejo e 4 ng/L para o rio Zêzere, e na água de captação subterrânea a concentração foi de 5 ng/L (Figura 8). As concentrações máximas de SFD na água superficial foram de 27 ng/L para o rio Tejo, e inferiores a 2 ng/L para o rio Zêzere e água subterrânea. As concentrações máximas de SFX na água superficial foram de 23 ng/L para o rio Tejo, e inferiores a 2 ng/L para o rio Zêzere e água subterrânea. Para a SFD as concentrações forma inferiores a 2 ng/L para o rio Tejo e Zêzere, e 8 ng/L na água subterrânea. Refere-se que a presença dos antibióticos SFD, SFP e SFM é indicativa de contaminação agropecuária. Em comparação com o estudo realizado no estuário do rio Douro (Madureira, et al., 2010), o antibiótico SFX estava presente numa gama de concentração superior no rio Douro (8 a 52.5 ng/L) do que a concentração máxima reportada neste estudo para o rio Tejo (23 ng/L).

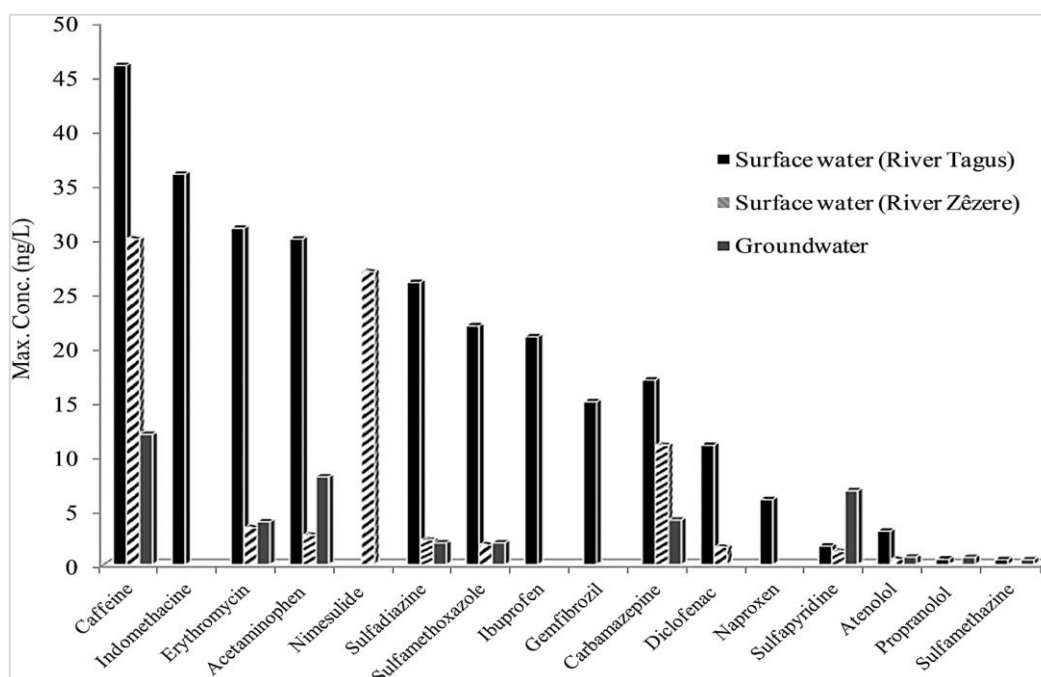


Figura 8. Concentrações máximas encontradas nos pontos de captação de água da EPAL (reproduzido de (Gaffney, et al., 2015)).

Na água de consumo foram quantificadas concentrações máximas de ERT de 5 ng/L, SFX de 1.3 ng/L, SFP de 1.9 ng/L, SFD de 1 ng/L e SFM de 0.5 ng/L. Com base nestas concentrações de antibióticos detetadas nas zonas de captação e na água de consumo, foi realizada uma avaliação de risco ambiental e para a saúde humana. Esta avaliação teve por base a determinação do quociente de risco (RQ) entre a concentração máxima detetada de cada substância na água bruta e no respetivo PNEC (*predicted no-effect concentration*), no caso do risco ambiental, e concentração máxima detetada na água de consumo e respetivo DWEL (*drinking water equivalente level*), no caso do risco para a saúde. A determinação do DWEL considera a dose diária aceitável de cada substância, o peso dos indivíduos, um quociente de risco, e o volume médio de ingestão de água. O risco ambiental foi considerado elevado para a ERT (RQ = 1.55) e médio para o SFX, os restantes apresentavam risco baixo (Gaffney, et al., 2014). Na avaliação de risco para a saúde humana todos os antibióticos apresentavam riscos reduzidos (RQ < 0.0001), tendo os autores concluído que estes fármacos não representam risco para a saúde do consumidor no nível concentrações em que foram quantificados.

8.1.2 Estudos em águas residuais e hospitalares

Um estudo realizado em 2013 avaliou em 15 ETARs nacionais a presença de 11 fármacos, onde se incluíram a AZT e CIP, no efluente bruto e tratado das ETARs, comparando também o impacto da sazonalidade nestes resultados (Pereira, et al., 2015). O estudo envolveu 15 ETARs, onde se incluíram 6 inseridas na zona norte com a localização indicada no mapa apresentado na Figura

9. As amostras referentes ao período de primavera foram recolhidas em Maio, e as referentes ao período de verão foram recolhidas em Julho.



Figura 9. Localização das ETARs da zona norte incluídas no estudo avaliado (reproduzido de (Pereira, et al., 2015)).

A caracterização apresentada de cada ETAR, e os respetivos resultados das caracterizações realizadas aos antibióticos presentes são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo das concentrações de antibióticos detetados em 6 ETARs no norte na primavera e verão (Pereira, et al., 2015).

ETAR	Heq	Ponto descarga	Primavera				Verão			
			AZT (ng/L)		CIP (ng/L)		AZT (ng/L)		CIP (ng/L)	
			A	E	A	E	A	E	A	E
1	41 955	Rio Fervença	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	1800	1200
2	10 000	Rio Tua	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
3	57 748	Rio Tâmega	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	4200	< LQ
4	45 257	Oceano Atlântico	< LQ	< LQ	< LQ	609	< LQ	< LQ	17500	2800
5	255 557	Rio Ave	< LQ	< LQ	793	< LQ	< LQ	200	10400	5000
6	300 000	Oceano Atlântico	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	6800	3100

Abreviaturas: Heq – habitante equivalente; A – afluentes; E – efluente; AZT – azitromicina; CIP – Ciprofloxacina; LQ – limite quantificação.

LQs: Azitromicina entre 0.4-0.5 ng/L; Ciprofloxacina 5-6 ng/L;

É possível verificar que existe uma diferença considerável nas concentrações detetadas de CIP na Primavera e no Verão. Esta constatação não foi discutida de forma detalhada, sendo apenas referido que as alterações de caudal podem influenciar a carga de fármacos que chegam às ETARs. No entanto, verificou-se nas ETARs 3, 4 e 6 uma redução do caudal de afluente, mas nas

ETARs 1, 2 e 5 houve um aumento de caudal nestas estações, portanto o aumento das concentrações não foi apenas devido a um efeito da concentração do afluente. Outra hipótese poderá ser um maior consumo destes fármacos no verão associado a infeções mais frequentes nesta altura do ano. As ETARs 4 e 5, que apresentaram as concentrações mais elevadas de CIP nos efluentes, estão inseridas em zonas rurais com produção agropecuária pelo que estes valores poderão estar associados a consumos de antibióticos no campo veterinário. No período de verão verificou-se para a CIP eficiência de tratamento entre os 33-100% nas ETARs avaliadas. Destaca-se em particular que a ETAR 5, inserida no rio Ave, apresentou uma eficiência de tratamento de 48% e que após tratamento o efluente continha uma concentração de 5000 ng/L de CIP.

Um estudo publicado em 2014 quantificou a presença de vários antibióticos no efluente de uma unidade hospitalar inserida no norte, que serve 3 milhões de habitantes, e também no afluente e efluente da ETAR urbana que recebe este efluente hospitalar (Varela, et al., 2014). Para esta avaliação foram recolhidas 7 amostras do efluente hospitalar e 21 amostras de afluente e efluente da ETAR (correspondendo a 3 dias consecutivos após recolha da amostra hospitalar), ao longo do período entre Outubro 2010 e Maio de 2011. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que no geral a concentração dos antibióticos analisados no afluente da ETAR é muito semelhante à concentração dos antibióticos no efluente hospitalar, embora este efluente apenas represente 0.1% do caudal de afluente que chega à ETAR.

Tabela 3. Quantificação de antibióticos presentes em efluente hospitalar e respetiva ETAR urbana (Varela, et al., 2014).

Antibiótico (ng/L)	Efluente Hospitalar	Afluente ETAR	Efluente ETAR
Penicilina G	860 (<120–1390)	1030 (<120–2230)	800 (<120–1430)
Penicilina V	(<130–630)	(<130–420)	(<130–300)
Ciprofloxacina	880 (<130–2530)	440 (<130–860)	270 (<130–430)
Ofloxacina	590 (<130–1420)	340 (<130–730)	230 (<130–300)
Sulfametoxazol	890 (<120–1540)	830 (420–3000)	350 (160–550)
Sulfatiazol	(<120–280)	(<120–170)	(<120)
Sulfametazina	(<130–1700)	(<130–1300)	(<130)
Tetraciclina	1060 (520–2140)	1750 (440–4160)	990 (<120–2420)
Oxitetraciclina	(<140)	(<140)	(<140)
Doxyciclina	(<120–660)	(<120–180)	(<102–180)

Nota: São apresentados valores médios e a gama de concentrações das amostras entre parêntesis.

Esta avaliação confirma que os efluentes hospitalares não têm um impacto tão significativo para a concentração de antibióticos no meio hídrico, existindo outras fontes, tais como domésticas ou agropecuária, que poderão ter um contributo mais significativo. Os números de consumo de antibióticos monitorizados pela DGS também estão de acordo com esta avaliação (DGS, 2016).

Verificou-se neste estudo que a eficiência de tratamento destas substâncias na ETAR é reduzida (inferior a 55%). Em comparação com o estudo anterior, a gama de contração de CIP na ETAR é inferior, e a eficiência de tratamento é de 38%. Os antibióticos que são descarregados pela ETAR em maior concentração são a Penicilina G (PENG; 800 ng/L) e TET (990 ng/L).

No âmbito de um trabalho de mestrado, foi avaliada a presença de vários antibióticos na ETAR de Parada, na Maia, que descarrega para o rio Leça (Figueiredo, 2012). Foram recolhidas amostras de afluente e efluente em 8 campanhas de amostragem realizadas entre Março e Abril de 2009. As concentrações de antibióticos presentes nesta ETAR, quer no afluente quer no efluente, foram bastante superiores às concentrações reportadas no estudo anterior (Tabela 4). Os antibióticos presentes em concentrações superiores a 1 000 ng/L no efluente foram CIP, TET, sulfatiazol (STZ) e PENG, que apresentou valores superiores a 10 000 ng/L de forma consistente no afluente, e foi o único antibiótico para o qual se observou eficiência de remoção negativa.

Tabela 4. Quantificação de antibióticos presentes no afluente e efluente da ETAR de Parada (Figueiredo, 2012).

Antibiótico (ng/L)	Afluente ETAR Parada	Efluente ETAR Parada	ER (%)
Penicilina G	7710 (520-12020)	13870 (12420-18970)	-80
Penicilina V	1120 (410-2720)	130 (130-350)	88.4
Ciprofloxacina	1980 (300-5400)	1340 (370-1890)	32.3
Ofloxacina	4270 (1100-12350)	960 (310-1780)	77.5
Clorotetraciclina	1070 (200-4110)	640 (300-1120)	40.2
Sulfatiazol	5810 (1180-10920)	2570 (610-3330)	55.8
Sulfametazina	2380 (1080-4540)	210 (130-740)	91.2
Tetraciclina	11410 (7340-18200)	3770 (2320-5800)	67
Oxitetraciclina	9450 (6220-14700)	140 (140-140)	98.5
Enrofloxacina	1240 (760-1610)	630 (280-1190)	49.2
Doxyciclina	5340 (1360-8800)	120 (120-2120)	97.8

Nota: São apresentados valores médios e a gama de concentrações das amostras entre parêntesis.

Um estudo recente, desenvolvido sobre a bacia hidrográfica do rio Lis, avaliou a ocorrência de um conjunto de 33 fármacos e metabolitos no rio Lis e nos afluentes e efluentes de duas ETARs localizadas ao longo do rio (Paíga, et al., 2016). As concentrações médias de antibióticos detetados nas amostras recolhidas são apresentadas na Figura 10. Os antibióticos CIP e SFX foram detetados em maior frequência e concentração nas duas ETARs, tendo-se verificado na

ETAR de Coimbra eficiências de tratamento de 100 e 66% para CIP e SFX, respetivamente, e na ETAR de Olhalvas de 67 e 66%, respetivamente. A presença de CIP e SFX foi detetada no rio nos pontos a montante das ETARs, o que demonstra o impacto das descargas das ETARs na contaminação do rio com estes fármacos. A deteção de sulfametazina na água superficial (antibiótico animal) e a sua ausência nas duas ETARs é indicativa de contaminação de origem agro-pecuária, decorrente da fertilização de campos agrícolas. A presença de SFX, AZT e CLM nos níveis de concentração detetados no rio pode representar potencial ecotoxicidade para os organismos aquáticos. Os possíveis focos de contaminação do rio foram apontados como sendo as ETARs urbanas, descargas de efluentes não tratados e atividade pecuária.

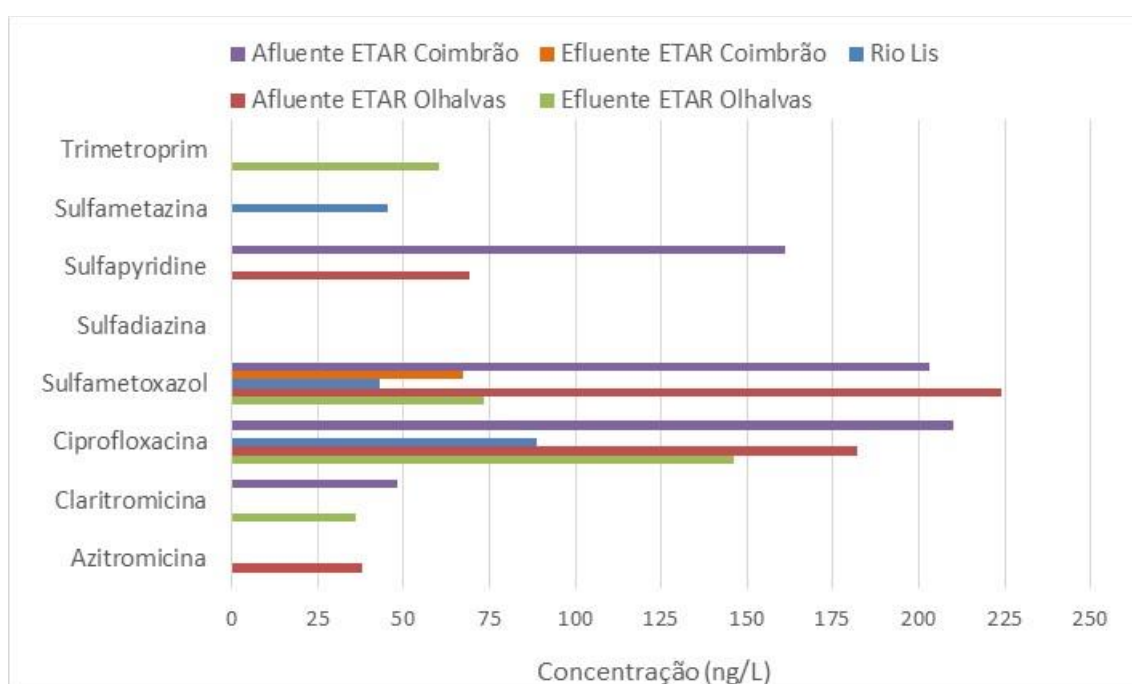


Figura 10. Concentrações de antibióticos detetados no rio Lis e afluentes e efluentes de duas ETARs (Paíga, et al., 2016).

No âmbito de um estudo realizado à escala piloto sobre a aplicação de tratamento fotocatalítico por dióxido de titânio para tratamento de poluentes químicos em ETARs, foram quantificados 22 poluentes emergentes presentes no efluente tratado da ETAR de Febros, que é descarregado no rio Douro (Sousa, et al., 2012). Entre os vários compostos analisados foi quantificada a presença de quatro antibióticos, nomeadamente AZT, CIP, norfloxacin (NFX) e ofloxacin (OFX), numa gama de concentrações entre 101 – 631 ng/L, no efluente tratado da ETAR (antes do tratamento fotocatalítico). Neste estudo os autores atingiram com aplicação acumulada de 32 kJ de energia UV por litro de efluente, a degradação completa de 19 dos 22 poluentes emergentes, onde se incluem três dos antibióticos (apenas se verificou 35% de remoção da ciprofloxacina).

Noutro estudo realizado para investigar o tratamento fotocatalítico de águas com ou sem ozono, foi caracterizada a presença de antibióticos num efluente tratado de uma ETAR do norte após tratamento secundário, e em água superficial numa zona de captação de uma ETA também no norte (Moreira, et al., 2016). No efluente tratado da ETAR foram realizadas três campanhas de amostragem em dias diferentes em que se quantificaram os seguintes antibióticos e respetivas gamas de concentrações: AZT (316-1000 ng/L), claritromicina (CLM) (32-1000 ng/L), ERT (32-316 ng/L), SFX (1-630 ng/L) e trimetoprim (TRM) (1-180 ng/L). Destacam-se as concentrações elevadas de AZT e CLM no efluente que é descarregado. Na água superficial, apenas foi detetado e quantificado a CLM em três amostras numa gama de concentração de 1.36-4.13 ng/L. O tratamento fotocatalítico por si só apresentou baixas eficiências de remoção dos fármacos detetados, contudo quando combinado com ozono a remoção de todos os fármacos foi atingida, tendo-se detetado apenas concentrações residuais de claritromicina e eritromicina após tratamento (ER > 90%). No que refere à remoção de bactérias resistentes, os autores reportam que verificaram após tratamento que estas bactérias podem crescer novamente até concentrações idênticas às caracterizadas na água pré-tratada, portanto este tratamento não foi eficaz nesta perspetiva.

Para mais informação sobre eficiências de tratamento de antibióticos, recomenda-se a consulta de um artigo de revisão publicado em 2011, que inclui um levantamento exaustivo de estudos internacionais realizados entre 2000 e 2010 sobre tecnologias de tratamento e taxas de degradação de antibióticos presentes em águas contaminadas (Homem & Santos, 2011).

Tabela 5. Resumo das concentrações de antibióticos em amostras de água reportadas nos estudos analisados.

REF.	Zona/ Bacia	Tipologia água	Descrição amostra	Antibióticos (ng/L)																				
				AMX	PENV	PENG	AZT	ERT	CLM	CIP	DXC	CLM	TET	ENRO	NFX	OFX	OXT	SFX	STZ	SFD	SFP	SFM	TMP	MET
(APA, 2012)	Norte	Superficial	Areias de Vilar															11,5						
(APA, 2012)	Norte	Superficial	Barca d'Alva															2,2						
(APA, 2012)	Norte	Superficial	Albufeira Crestuma															8,9						
(Madureira, et al., 2010)	Douro	Superficial	11 amostras ao longo do estuário															8-52						
(Sousa, et al., 2011b)	Douro	Superficial	montante ETAR Febros				<LQ																	
(Sousa, et al., 2011b)	Douro	Superficial	Jusante ETAR Febros				150																	
(Martins, 2012)	Cávado	Superficial	Rio cávado				524			500														
(AdDP, 2010)	Douro	Várias	Várias	<40 00		<40 00		<40 000					<10 000 0				<10 000 0		<10 000 0			<50 000		
(Moreira, et al., 2016)	Norte	Superficial	Zona de captação de ETA no Norte						1,36 - 4,13															
(Madureira, et al., 2009)	Douro	Superficial	Rio Douro (4 locais)															16.9 – 53.3						
(Gaffney, et al., 2014)	Tejo	Água consumo humano	Saida estação tratamento do rio Zêzere					0,09										<LO D		<LO D	<LO D	<LO D		

REF.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição amostra	AMX	PENV	PENG	AZT	ERT	CLM	CIP	DXC	CLM	TET	ENRO	NFX	OFX	OXT	SFX	STZ	SFD	SFP	SFM	TMP	MET
(Sousa, et al., 2012)	Douro	Residual	Efluente tratado (ETAR Febros)				631			254					138	101								
(Moreira, et al., 2016)	Norte	Residual	Captação montante ETAR do Norte				316-1000	32-316	32-1000									1-630					1-180	
(Sousa, et al., 2011a)	Douro	Residual	Afluente ETAR 1 (Febros)				571			< 6														
(Sousa, et al., 2011a)	Douro	Residual	efluente ETAR 1 (Febros)				530			<4														
(Sousa, et al., 2011a)	Douro	Residual	Afluente ETAR 2				617			<6														
(Sousa, et al., 2011a)	Douro	Residual	efluente ETAR 2				836			<4														
(Pereira, et al., 2015)	Rio Fervença	Residual	Afluente ETAR 1 (verão)							1800														
(Pereira, et al., 2015)	Rio Fervença	Residual	Efluente ETAR 1 (verão)							1200														

REF.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição amostra	AMX	PENV	PENG	AZT	ERT	CLM	CIP	DXC	CLM	TET	ENRO	NFX	OFX	OXT	SFX	STZ	SFD	SFP	SFM	TMP	MET
(Pereira, et al., 2015)	Rio Tâmega	Residual	Afluente ETAR 3 (verão)							4200														
(Pereira, et al., 2015)	Rio Tâmega	Residual	Efluente ETAR 3 (verão)							< 6														
(Pereira, et al., 2015)	Oceano Atlântico	Residual	Afluente ETAR 4 (verão)							17500														
(Pereira, et al., 2015)	Oceano Atlântico	Residual	Efluente ETAR 4 (verão)							2800														
(Pereira, et al., 2015)	Rio Ave	Residual	Afluente ETAR 5 (verão)							10400														
(Pereira, et al., 2015)	Rio Ave	Residual	Efluente ETAR 5 (verão)							5000														
(Pereira, et al., 2015)	Oceano Atlântico	Residual	Afluente ETAR 6 (verão)							6800														
(Pereira, et al., 2015)	Oceano Atlântico	Residual	Efluente ETAR 6 (verão)							3100														

REF.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição amostra	AMX	PENV	PENG	AZT	ERT	CLM	CIP	DXC	CLM	TET	ENRO	NFX	OPX	OXT	SFX	STZ	SFD	SFP	SFM	TMP	MET
(Figueiredo, 2012)	Rio Leça	Residual	Afluente ETAR Parada		112 0	771 0				198 0	534 0	107 0	114 10	124 0		427 0	945 0		581 0			238 0		
(Figueiredo, 2012)	Rio Leça	Residual	Efluente ETAR Parada		130	138 70				134 0	120	640	377 0	630		960	140		257 0			210		
(Varela, et al., 2014)	Porto	Residual	Efluente		<13 0- 300	800				270	<12 0- 180		990			230	<14 0	350	<12 0			<13 0		
(Pena, et al., 2007)	Mondego	Superficial	Rio Mondego							79,6 - 119, 2	67- 102, 5													
(Paíga, et al., 2016)	Lis	Superficial	Rio Lis (9 campanhas)				<LD		nd	88,7								43		nd	nd	45,4	nd	
(Paíga, et al., 2016)	Lis	Residual	Afluente ETAR Olhalvas				37,8		<LD	182								224		<LD	69,4	nd	nd	
(Paíga, et al., 2016)	Lis	Residual	Efluente ETAR Olhalvas				<LD		36,1	146								73,4		nd	nd	nd	60,3	
(Paíga, et al., 2016)	Lis	Residual	Afluente ETAR Coimbrão				<LD		48,2	210								203		nd	161	nd	nd	
(Paíga, et al., 2016)	Lis	Residual	Efluente ETAR Coimbrão				<LD		<LD	nd								67,5		nd	nd	nd	<LD	

REF.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição amostra	AMX	PENV	PENG	AZT	ERT	CLM	CIP	DXC	CLM	TET	ENRO	NFX	OFX	OXT	SFX	STZ	SFD	SFP	SFM	TMP	MET
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Efluente Hospital Universitário				374 8	209	62,6	116 24			<LD			122 22		301 5					184 9	163 8
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Efluente Hospital Central				188 9	<LD	7,56	367 3			<LD			730 2		189 7					528	192
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Efluente Hospital Pediátrico				85,8	108	135	503			<LD			104		401					337	586
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Efluente Maternidade				840	140 7	32,5	572			<LD					89,6					13,5	751
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Afluente de ETAR				186	92,7	22,2	221			12,1			946		912					124	51,1
(Santos, et al., 2013)	Coimbra	Residual	Efluente ETAR				171	71,2	22,4	369			<LD			233		950					167	51,1

8.2 RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS A ANTIBIÓTICOS

Foi realizado um levantamento de estudos, teses e artigos científicos que apresentam informação relativa à presença de bactérias resistentes a antibióticos no domínio hídrico. Estes estudos debruçam-se sobre diversas tipologias de águas, tendo sido dada mais relevância a águas superficiais e residuais. Em função da relevância dos estudos analisados para este levantamento, são apresentados resumos detalhando os principais resultados. Esta avaliação foi ainda dividida em três subcapítulos que incluem a revisão da investigação sobre as bactérias multirresistentes no rio Ave, e outros estudos que caracterizaram o perfil de resistência de bactérias presentes em águas superficiais e residuais.

Apresenta-se no final desta secção na Tabela 7 a compilação de percentagens de resistência a antibióticos reportadas para bactérias isoladas referenciadas nos estudos analisados, que incluem os estudos resumidos e outros que foram identificados.

8.2.1 Estudos realizados no Rio Ave

Este levantamento foi iniciado pela dissertação de mestrado realizada sobre a qualidade do rio Ave, que incluiu o estudo da resistência a antibióticos de bactérias isoladas a longo do rio (Vasconcelos, 2015). Salienta-se que esta dissertação surgiu na sequência de outro trabalho realizado sobre a caracterização de perfis de resistência de *E. coli* a antibióticos da classe carbapenemos, isoladas de amostras de água superficial do rio Ave recolhidas em 5 locais na zona de Santo Tirso (Poirel, et al., 2012). Nesse estudo anterior foi identificada uma estirpe de *E. coli* resistente ao antibiótico imipenem (IMP), que continha uma enzima que degrada carbapenemos (carbapenase). O gene responsável por esta enzima e resistência da *E. coli* foi identificado num plasmídeo desta bactéria (elemento genético móvel) que, como teste, foi transferido para outra estirpe não resistente, o que permitiu que esta adquirisse esta resistência – demonstrando que esta transferência de genes de resistência a outras bactérias é possível. Os autores deste estudo referem que esta foi a primeira *E. coli* isolada em Portugal com este perfil de resistência, e que (até à data do estudo) não havia registo de identificação deste perfil de resistência em *E. coli* associada a infeções clínicas. Como justificações para esta descoberta os autores avançam a hipótese de existirem indivíduos nas populações vizinhas que possam estar a contaminar o ambiente com estas bactérias, ou que existam bactérias no ambiente do rio que contenham já esta resistência. O nível de preocupação reforçado neste estudo prende-se com o facto da classe do antibiótico em questão – carbapenemos - ser considerada a última alternativa terapêutica para bactérias multirresistentes e estar reservado para uso hospitalar.

No âmbito da dissertação de mestrado realizada por Vasconcelos (2015) foram recolhidas amostras de água superficial e biofilme (raspado de pedras) em 6 pontos ao longo do rio, que foram designados por A a F, respetivamente desde o ponto mais próximo da nascente, em Ponte da Parada, Agra, até ao ponto mais afastado, em Ponte da Lagoncinha, Lousado (Figura 11). Os pontos foram selecionados devido à localização próxima de descargas de ETARs, zonas industriais ou de efluente de rios secundários (Tabela 6). Foram realizadas 5 campanhas de amostragem ao longo do ano entre Junho 2014 e Maio 2015.

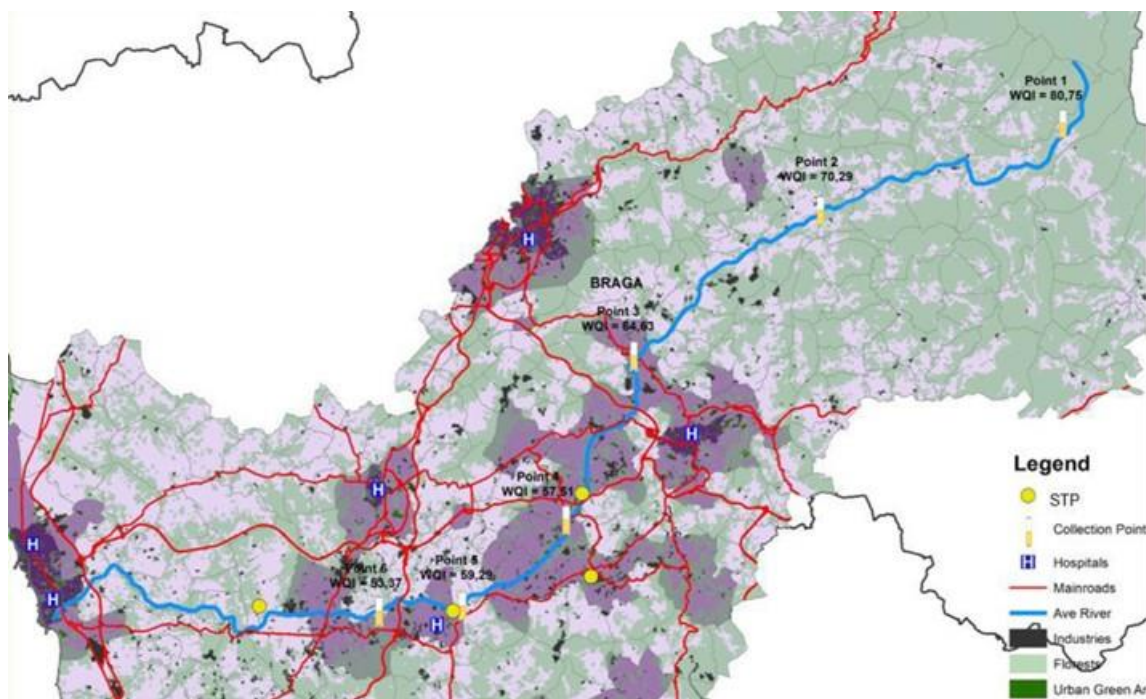


Figura 11. Localização dos pontos de amostragem onde foram realizadas as recolhas de amostras (Vasconcelos, 2015).

Tabela 6. Descrição da localização dos pontos de amostragem no rio Ave (Vasconcelos, 2015).

Ponto	Local	Descrição do local
A	Ponte da Parada, Agra, Vieira do Minho	Próximo da nascente, em zona montanhosa, considerado local pristino
B	Praia Fluvial da Rola, Arosa, Guimarães	Após duas barragens existentes no rio (Ermal-Guilhofrei e Andorinhas)
C	Calçada de Barco, Caldas das Taipas, Guimarães	Considera-se o local de início dos grandes focos populacionais adjacentes ao rio
D	Azenha Velha, Riba D'Ave, Vila Nova de Famalicão	Situado a jusante da ETAR de Serzedelo e de um foco industrial (têxtil, curtumes e siderurgias)
E	Parque Urbano da Rabada, Burgães, Santo Tirso	Após junção com efluente do rio Vizela, considerado dos mais poluídos da área; a montante mantém-se atividade industrial e pecuária relevante
F	Ponte da Lagoncinha, Lousado, Vila Nova de Famalicão	A jusante da ETAR da Rabada, zona industrial da Várzea, e da Escola Profissional Agrícola que tem canal de drenagem para o rio Ave

Este estudo incidiu sobre a avaliação de bactérias dos géneros *E. coli* e *Enterococcus spp.*, que são bactérias comensais da flora intestinal humana e animal, e que são os principais indicadores de contaminação fecal no meio hídrico. Inicialmente, as bactérias destes géneros foram isoladas em meios de cultura seletivos para cada género e suplementados com antibióticos de diferentes classes, para permitir a identificação de crescimento de bactérias pouco suscetíveis a cada classe. Das bactérias isoladas em placas foram realizados 229 antibiogramas para *E. coli* e 176 para *Enterococcus spp.* por difusão em disco. Apresenta-se na Figura 12 um exemplo de antibiogramas realizados com isolados de *E. coli*, onde é possível ver à esquerda um isolado muito suscetível aos vários antibióticos, e à direita um isolado que apresenta resistência a muitos antibióticos (halos nulos).



Figura 12. Exemplo de antibiogramas por difusão em disco realizados com isolados de *E. coli*. Retirado de Vasconcelos (2015).

Relativamente aos isolados de *E. coli*, verificou-se no geral que a maioria dos isolados multirresistentes (MDR) foram detetadas nos pontos D, E e F (Figura 13). **Foram identificados 149 isolados de *E. coli* MDR, 1 isolado Extremamente resistente (XDR; apenas suscetível a pelo menos 1 agente de 2 classes de antibióticos), e um isolado Pan-resistente (PDR; não é suscetível a nenhum agente de todas as classes).** Estes dois últimos isolados apresentam um perfil de resistência mais alargado e preocupante, sendo inclusive resistentes ao antibiótico IMP, foram isolados do local D. A resistência mais comum foi à tetraciclina (TET) e ampicilina (AMP), e o conjunto de resistências mais comum foi: AMP, TET, SFX e cloranfenicol (CLF). Estas bactérias MDR foram na sua grande maioria isoladas nas amostras de água e um número reduzido do biofilme.

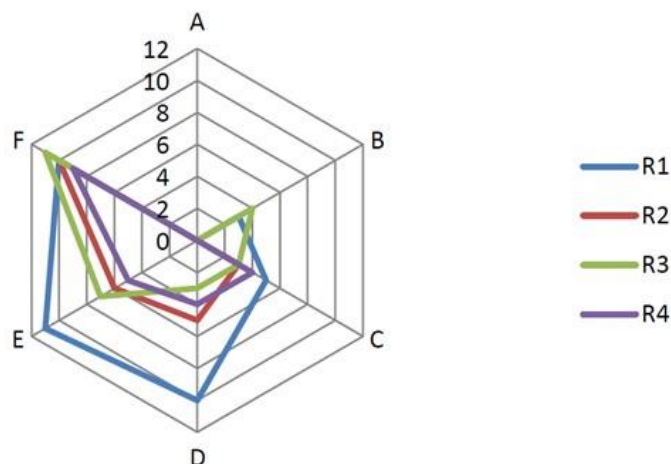


Figura 13. Distribuição do número de isolados de *E. coli* MDR identificados nos 6 locais (A a F) e nas diferentes campanhas de recolha (R1 a R4); (Vasconcelos, 2015).

Foram avaliados os filogrupos de cada *E. coli* MDR, e os mais comuns foram os A e B1, que são bactérias típicas de contaminação de origem fecal e mais comuns de serem encontrados em rios. A bactéria PDR é do filogrupo E, que são não comensais e mas próximas das *E. coli* patogénicas produtoras de toxinas que representam maior risco para a saúde humana. Por esta razão, os autores contactaram os hospitais da região que afirmaram não terem registo de infeções por este tipo de *E. coli* resistente ao IMP.

Relativamente aos isolados de *Enterococcus spp.*, verificou-se no geral que os isolados MDR foram inferiores em número às *E. coli* isoladas. Verificou-se no geral que os isolados de *Enterococcus spp.* MDR aparecem após o ponto C, e a maioria foi detetada nos pontos D e F (Figura 14). Foram identificados 34 isolados com características MDR, e outros dois isolados não MDR mas que foram considerados preocupantes por apresentarem resistência a nitroforantoina (NTF), cuja resistência de *Enterococcus spp.* é extramente rara. A avaliação do filogrupo indicou que os isolados se dividiam essencialmente em estirpes de *E. fecalis* e *E. faecium*.

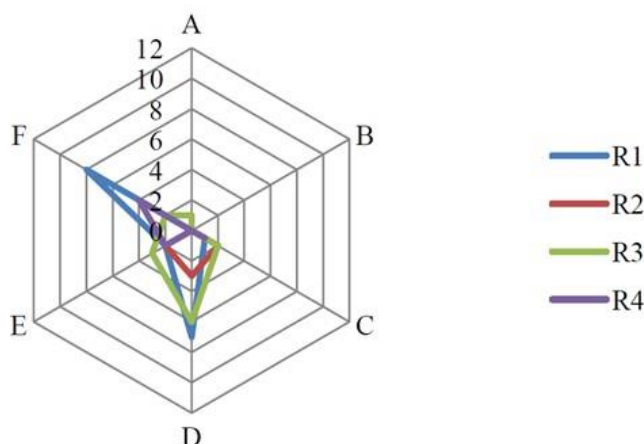


Figura 14. Distribuição do número de isolados de *Enterococcus spp.* MDR identificados nos 6 locais (A a F) e nas diferentes campanhas de recolha (R1 a R4); (Vasconcelos, 2015).

Na discussão da tese os principais pontos destacados sobre as bactérias MDR foram os seguintes:

- Foram encontrados isolados resistentes a antibióticos utilizados como último recurso a nível clínico, como *E. coli* resistente a IMP, e no caso dos *Enterococcus spp.* à vancomicina (VAN) e teicoplanina (TCP). Ambos são perfis de resistência muito pouco frequentes e preocupantes.
- Os locais D, E e F foram os locais mais contaminados com MDR; destaca-se que foi no ponto D que se isolaram as duas *E. coli* com perfil de resistência XDR e PDR, que tinham filogrupos patogénicos (não comensais).
- A existência de ETARs nas imediações dos locais D, E e F é uma das razões apontadas para o elevado número de bactérias MDR isoladas, uma vez que nestes locais confluem afluentes contaminados por antibióticos (domésticos e hospitalares), e existe uma elevada densidade de microrganismos que potencia a transferência horizontal de genes que conferem resistência.
- O contacto com hospitais locais revelou que não tinham registo de infeções por *E. coli* com esta resistência, embora tenham existido raros casos de *Enterococcus* resistentes à vancomicina.
- Embora em menor número, o facto de algumas bactérias MDR terem sido isoladas do biofilme é preocupante, na medida em que este pode funcionar como reservatório de resistências que pode ser facilmente passada para outras bactérias.

Um artigo publicando recentemente do mesmo grupo de investigação reporta o isolamento de 4 estirpes de *E. coli* resistentes a antibióticos da classe de carbapenémicos do rio Ave (Kieffer, et al., 2016). Este estudo terá sido desenvolvido na mesma altura que a tese de mestrado, mas são identificados mais dois isolados com este tipo de resistência. Considerando que em 2010 os autores já tinham isolado *E. coli* do rio Ave com esta resistência a carbapenémicos, os autores especulam que este rio poderá promover o surgimento desta resistência, ou então que existe um foco de contaminação ambiental. No artigo é referido que em dois estudos clínicos realizados em Portugal foi identificado o mesmo gene que codifica a enzima responsável pela resistência da *E. coli* (carbapenemase) em dois outros géneros de bactérias (*Klebsiella* e *Pseudomonas*), o que, segundo os autores, destaca Portugal do restante panorama Europeu onde este perfil de resistência é raro.

Para avaliar a predominância da resistência a antibióticos da classe carbapenémicos (ex. imipenem) em bactérias género *E. coli* isoladas no meio hídrico, alargou-se a presente pesquisa a estudos internacionais que investigaram esta resistência. Salienta-se que foram encontrados poucos estudos com referência ao antibiótico IMP, e dentro destes a maioria referia não ter encontrado *E. coli* resistentes. Destaca-se um estudo realizado numa secção densamente povoada do estuário do rio Sena em França, que incluiu amostragem ao longo do rio e no efluente da ETAR urbana de maior dimensão (550 000 habitantes), que procurou num conjunto de 900 isolados de *E. coli* a ocorrência de resistência ao IMP e não identificou nenhum isolado com esta resistência (Laroche, et al., 2009). Um resultado semelhante foi reportado num estudo

realizado nos EUA que pesquisou esta resistência em várias *E. coli* isoladas de vários tipos de água incluindo rios e lagos (Janezic, et al., 2013). Contudo, num estudo realizado na Polónia que incluiu amostras de efluentes hospitalares, ETAR municipal, e água superficial de rio que recebe estes efluentes, foram detetados isolados de *E. coli* resistentes ao IMP (entre 1 a 4 isolados em cada ponto de amostragem) desde o efluente hospitalar até ao rio (Korzeniewska, et al., 2013). Um estudo realizado em efluentes hospitalares (2 hospitais) na Índia identificou 6 isolados de *E. coli* resistentes ao Imipenem (de dois hospitais) num conjunto de 190 isolados (Chandran, et al., 2014).

Pelo exposto, verifica-se que a resistência a antibióticos da classe carbapenénos, em particular ao IMP, é ainda reduzida no meio hídrico. Compreende-se assim que o facto de se terem isolado bactérias *E. coli* com esta resistência no rio Ave em pelo menos dois momentos (2010 e 2015), seja uma descoberta preocupante. Refere-se ainda, que Portugal é atualmente o 3º país europeu com maior consumo desta classe de antibióticos (2.3x superior à média EU), pelo que poderá ser esperado que a resistência microbiana a esta classe possa ser mais frequente em Portugal (DGS, 2016).

8.2.2 Estudos em águas superficiais

No âmbito de um trabalho de uma dissertação de mestrado, foi investigada a presença de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos nas águas superficiais do rio Douro, e a correlação desta resistência com a presença de metais pesados (Almeida, 2015). As amostras foram recolhidas na albufeira de Crestuma-Lever entre março e Abril de 2015. De 4 isolados foi identificado 1 com perfil de multirresistência às classes β -lactâmicos, tetraciclina e macrolídeos (PEN, ERT, AMX, TET e oxacilina (OXA)). Neste isolado foi confirmada a presença do gene *mecA* que é associado à resistência a OXA, e que está relacionada com a resistência de *S. aureus* MRSA a metilicina (MET); este gene codifica uma proteína que permite a degradação de antibióticos β -lactâmicos, que quando transferido para estirpes *S. aureus* pode representar um risco elevado para a saúde humana. As correlações entre perfis de resistência e presença de metais pesados foram inconclusivas.

Outro trabalho de mestrado teve como objetivo a determinação da prevalência de bactérias do género *staphylococcus spp.* resistentes a antibióticos em amostras de água superficial do rio Paiva (Portugal, 2015). Estas bactérias foram isoladas em diferentes meios seletivos, tendo-se identificado 39 isolados do género *staphylococcus spp.* pertencentes a 9 espécies diferentes. Foi avaliada a resistência a 12 antibióticos, pertencentes a 7 classes distintas. De forma geral, as bactérias apresentaram perfis de resistência mais elevados para a TET (56% de isolados resistentes), seguida por ERT (28% de isolados resistentes). Neste estudo não foram encontrados bactérias com perfil MDR.

Outro trabalho de mestrado avaliou a prevalência de bactérias coliformes e *E. coli* resistentes aos antibióticos CIP e estreptomicina (EST) no Rio Douro, especificamente na albufeira de

Crestuma-Lever (Correia, 2014). Os isolados foram expostos a concentrações crescentes de cada antibiótico para avaliar a sua suscetibilidade. Na exposição à CIP obteve-se para a *E. coli* uma prevalência média de 20,9% e de 0,2% para concentrações de 2 mg/L e 150 mg/L, respetivamente. Na exposição a EST, os valores de prevalência média variaram entre os 7,7% e os 0,2% para as concentrações de 250 mg/L e 600 mg/L, respetivamente. O autor concluiu que a prevalência de bactérias coliformes resistente a baixas concentrações destes antibióticos foi diminuta, sugerindo que a maioria das bactérias presentes no Rio Douro é suscetível à ação dos antibióticos estudados.

No âmbito de uma dissertação de mestrado, a resistência de bactérias *E. coli* isoladas de água superficial do rio Douro (Albufeira de Crestuma) foi avaliada para os antibióticos MRP, CFT, CIP, GEN e STM (Esparrinha, 2014). Todos os isolados (8) eram suscetíveis ao MRP e CFT, e as percentagens de resistências para os restantes antibióticos foram 3,2% para GEN, 11,9% para STM e 11,5% para CIP.

Num trabalho desenvolvido em colaboração com a AdDP, foi avaliada a resistência a antibióticos em bactérias isoladas e águas superficiais do rio Ferreira e rio Douro (Narciso-da-Rocha, et al., 2015). Foram isoladas 85 bactérias MDR do rio Ferreira, sendo os géneros mais comuns *Pseudomonas* (21%), *Chryseobacterium* (14%) e *Stenotrophomonas* (11%). Foram isoladas 65 bactérias MDR do rio Douro que pertenciam maioritariamente aos géneros *Chitinophaga* (33%) e *Aeromonas* (10%). As resistências mais prevalentes foram detetadas para os antibióticos ceftazidima (38% e 57%), meropenem (MRP) (24% e 52%), CIP (19% e 34%) e GEN (31% e 45%) entre os isolados dos rios Ferreira e Douro, respetivamente (Figura 15). Embora parte dos isolados pertençam a géneros de bactérias ambientais (não patogénicas), estas podem servir de reservatórios de resistência para outras patogénicas (Narciso-da-Rocha & Manaia, 2016).

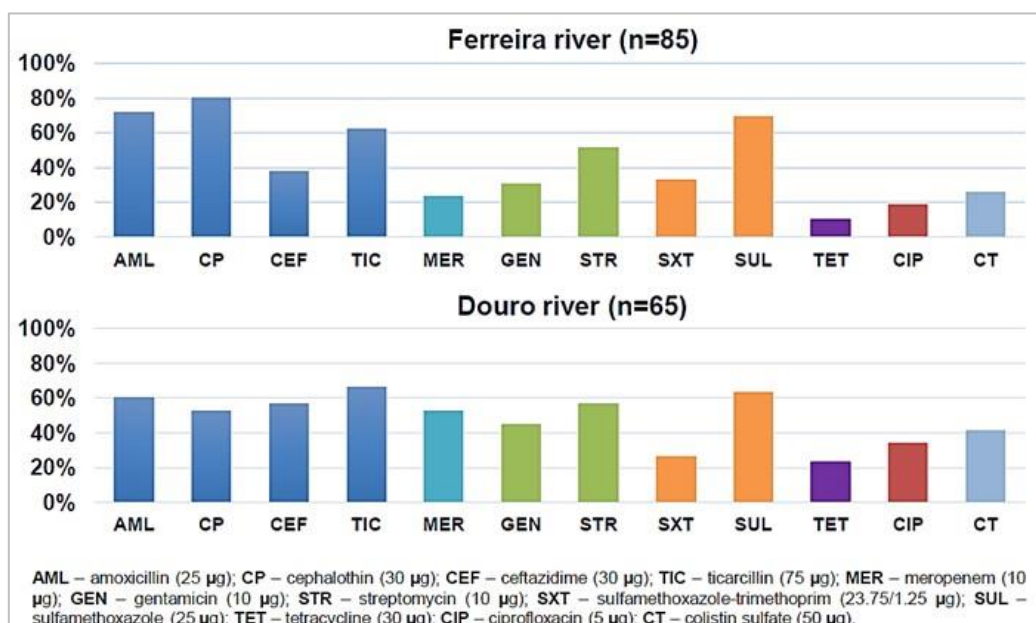


Figura 15. Percentagem de resistência a antibióticos em bactérias isoladas do rio Ferreira e rio Douro (Reproduzido de (Narciso-da-Rocha, et al., 2015)).

A contaminação de águas superficiais e residuais com espécies do género *Enterococci spp.* resistentes à vancomicina foi avaliada na região do grande Porto (2001-2002), num estudo que englobou recolhas de águas da rede de saneamento a montante e jusante de hospitais, e nas margens do rio Douro a jusante das descargas de ETARs, e do rio Coura e rio Sousa (Novais, et al., 2005). Foram encontradas bactérias desta espécie resistentes em 11 das 14 amostras recolhidas de águas da rede de saneamento a jusante de unidades hospitalares, e em 2/3 das amostras recolhidas no rio Douro. Destaca-se que não foram detetadas bactérias resistentes a VAN deste género nas amostras de águas da rede de saneamento a montante de hospitais, nem nas amostras de água superficial dos rios Coura e Sousa. As taxas de resistência dos isolados a outros antibióticos, como a AMP, CIP, EST, STP e GEN também eram superiores nos isolados da rede de saneamento a jusante das unidades hospitalares quando comparadas com as resistências caracterizadas a jusante. Este estudo demonstra que bactérias com elevada relevância clínica (*Enterococci* resistentes a VAN), com origem predominante de ambientes hospitalares, podem contribuir para a contaminação do ambiente onde estes efluentes são descarregados. Os autores referem que a redução da carga microbiana de efluentes hospitalares na fonte deve ser seriamente considerada para conter a contaminação de águas superficiais e evitar formação de reservatórios de resistência no ambiente.

8.2.3 Estudos em águas residuais e hospitalares

No âmbito de um trabalho de uma dissertação de mestrado, foi investigada a resistência a antibióticos em bactérias *E. coli* isoladas em duas ETARs da SIMDOURO: ETAR de Febros e ETAR de Lever (Barbosa, 2015). O estudo decorreu de Março a Junho de 2015 (12 campanhas de amostragem) e foram recolhidas amostras a montante e jusante dos reatores biológicos, incluindo-se na ETAR de Lever amostras antes e após a desinfeção por Ultravioleta. Os antibióticos selecionados para a realização deste trabalho foram ERT, AZT, CLM, OFX, a CIP, o SFX e TRM. A resistência aos antibióticos foi avaliada em função do diâmetro do halo nos testes de sensibilidade em disco. Os resultados mostram que ao longo das campanhas se verificaram variações no tamanho do halo para cada antibiótico testado (para a ERT a variação foi de 6 a 17mm). Verificou-se que a resistência à entrada e saída dos reatores era geralmente semelhante, tendo-se verificado casos de aumento e redução da resistência no efluente tratado para o mesmo antibiótico. Neste estudo as situações de resistência mais críticas (com halo nulo) foram observadas para os fármacos CLM, SFX e TRM. Não foram encontradas bactérias MDR, contudo este estudo não foi exaustivo no isolamento e teste de diversos isolados de *E. coli*. A eficiência da desinfeção por UV do efluente da ETAR de Lever variou entre 45 a 100% em 5 monitorizações realizadas. A baixa eficiência foi atribuída à necessidade de limpeza das lâmpadas.

O estudo realizado por Varela (2014), introduzido na secção anterior, avaliou a resistência a AMX e CIP em grupos de bactérias heterotróficas, *Aeromonads* e *Enterobacteria* (grupo que inclui *E. coli*) num efluente hospitalar no efluente da ETAR recetora da zona norte (Varela, et al., 2014). A prevalência da resistência a CIP era significativamente superior no efluente hospitalar, tendo-se também identificado os valores mais elevados de resistência para a AMX neste efluente. Com a exceção do grupo *Aeromonads*, em que se verificou uma redução na prevalência de resistência a AMX, salienta-se que ao longo do tratamento na ETAR se verificaram ligeiras reduções ou aumento da prevalência de resistência para ambos os antibióticos testados, o que demonstra que a prevalência de resistência se mantém após tratamento na ETAR (Figura 16). Neste estudo foi também avaliada a correlação entre os padrões de resistência a concentração de metais pesados. Os mecanismos de resistência bactérias a metais pesados e a antibióticos são semelhantes (Ferreira da Silva, et al., 2007), portanto a presença destes metais como contaminantes pode ser um fator seletivo para proliferação de bactérias resistentes. Os resultados revelaram que o efluente hospitalar tinha concentrações de arsénio e mercúrio superiores aos níveis quantificados na ETAR, tendo-se verificado uma correlação positiva entre a presença de arsénio e a resistência a CIP.

Bacterial group (Isolated on)	Wastewater samples	Mean (range) values of antibiotic resistance prevalence (%)	
		+ 32 µg/mL amoxicillin	+ 4 µg/mL ciprofloxacin
Heterotrophs (PCA)	Hospital effluent (n = 7)	37.8a (11.2–77.6)	19.5a (1.6–40.3)
	Raw inflow (n = 20 ^a)	28.3a,b (9.5–68.0)	7.6b (0.6–37.5)
	Treated effluent (n = 20 ^a)	23.7b (1.6–66.3)	9.3b (0.4–80.1)
<i>Aeromonads/Pseudomonads</i> (GSP)	Hospital effluent (n = 7)	48.8a (10.3–82.5)	10.7a (1.2–35.2)
	Raw inflow (n = 20 ^a)	41.3a,b (1.5–94.6)	3.7b (0.1–17.6)
	Treated effluent (n = 20 ^a)	29.0b (5.4–72.1)	3.3b (0.2–31.6)
<i>Enterobacteria</i> (mFC)	Hospital effluent (n = 7)	52.7a (4.0–91.9)	15.8a (0.6–52.5)
	Raw inflow (n = 20 ^a)	45.7a (0.2–88.5)	3.5b (0.1–14.1)
	Treated effluent (n = 20 ^a)	46.4a (0.1–96.9)	5.1b (<0.1–18.9)

a, b – significantly different ($p < 0.01$) in the three types of water on the basis of post hoc Tukey test for the comparison of samples of different origins.

^a No data was available for one sample.

Figura 16. Prevalência da resistência aos antibióticos nas águas residuais durante o período de monitorização (Varela, et al., 2014).

No âmbito de uma tese de mestrado foram caracterizados os perfis de resistência de géneros de bactérias patogénicas presentes nos efluentes tratados em ETARs (Martins, 2012). O estudo foi realizado em quatro ETARs (que não foram identificadas, mas que devem estar enquadradas na região norte), e as resistências foram avaliadas nas espécies *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. No que refere à *E. coli*, são reportadas resistências para os antibióticos AMP, CIP, cefotaxima, piperaciclina, cloranfenicol, GEN e IMP. Refere-se que nesta análise a resistência foi apresentada numa escala qualitativa, de menor a maior resistência entre os isolados dos quatro ETARs, o que dificulta a comparação com outros estudos e a compreensão do impacto destes resultados. Destaca-se que nos resultados é referida resistência de *E. coli* a IMP nas quatro ETARs, um resultado similar ao reportado no estudo do Ave, contudo na avaliação dos dados em bruto (halos) verifica-se que para as concentrações superiores de IMP as bactérias eram sensíveis, portanto deve tratar-se de redução de sensibilidade e não propriamente resistência.

Em 2016 foi conduzido um estudo exaustivo de caracterização dos perfis de resistência de bactérias do género *Enterococcus spp.* em 14 ETARs nacionais, englobando análises ao afluente, efluente e lamas (Martins da Costa, et al., 2006). Foram isolados neste estudo cerca de 1000 *Enterococcus spp.* cuja percentagem de resistência e localização da ETAR é apresentada na Figura 17. Foram encontrados 49.4% de isolados resistentes a mais de 1 antibiótico. Apenas 3.3% e 0.6% dos isolados eram resistentes a AMP e VAN, respetivamente, que são antibióticos de último recurso para *Enterococcus spp.*. Contudo, segundo os autores, os níveis de resistência aos antibióticos rifampicina (RIF), TET, ERT e nitrofurantoina são já preocupantes. Foram encontradas diferenças significativas entre as taxas de resistência encontradas em ETARs das capitais de distrito e de cidades de menor dimensão, onde se incluem os antibióticos VAN, quinupristin-dalfopristin, RIF, gentamicina (GEN) e nitrofurantoina.

Plant location	No. of isolates	Resistance to (%)									
		AMP	VAN	Q/D	TET	RIF	ERY	GEN	CHL	NIT	CIP
Aveiro ^a	61	6.6	1.6	24.6	39.3	54.1	21.3	3.3	3.3	19.7	9.8
Coimbra ^a	64	17.2	3.1	17.2	53.1	64.1	39.1	9.4	4.7	17.2	28.1
Porto Freixo ^a	74	2.7	1.4	24.3	36.5	60.8	29.7	6.8	4.1	18.9	16.2
Porto Sobreiras ^a	74	4.1	2.7	18.9	48.6	58.1	43.2	5.4	5.4	23.0	21.6
Leiria ^a	68	1.5	0.0	8.8	25.0	30.9	17.6	0.0	1.5	8.8	8.8
Évora ^a	60	1.7	0.0	8.3	40.0	46.7	26.7	1.7	3.3	28.3	8.3
Alcobaça	67	0.0	0.0	6.0	11.9	55.2	23.9	0.0	13.4	16.4	6.0
Silves	70	5.7	0.0	11.4	40.0	50.0	28.6	0.0	4.3	28.6	11.4
Oliveira de Frades	72	0.0	0.0	2.8	25.0	51.4	15.3	1.4	0.0	30.6	15.3
Vila Nova de Paiva	76	1.3	0.0	9.2	30.3	56.6	22.4	0.0	0.0	27.6	7.9
S. Pedro do Sul	65	1.5	0.0	7.7	32.3	44.6	21.5	4.6	4.6	35.4	20.0
Macedo de Cavaleiros	78	0.0	0.0	5.1	23.1	64.1	15.4	1.3	2.6	16.7	14.1
Sátão	86	0.0	0.0	9.3	32.6	55.8	24.4	1.2	1.2	17.4	16.3
Castro Daire	68	5.9	0.0	8.8	50.0	23.5	19.1	0.0	1.5	27.9	10.3
Overall % of resistance	70.2	3.3	0.6	11.5	34.6	51.5	24.8	2.4	3.5	22.5	13.9

AMP, ampicillin; VAN, vancomycin; Q/D, quinupristin-dalfopristin; TET, tetracycline; RIF, rifampicin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; CHL, chloramphenicol; NIT, nitrofurantoin; CIP, ciprofloxacin.
^a District capital.

Figura 17. Percentagem de resistência reportada para diferentes antibióticos em *Enterococcus spp.* isolados em ETARs nacionais (Martins da Costa, et al., 2006).

Os autores sugerem que os efluentes hospitalares podem contribuir para o aumento de bactérias MDR encontradas nas ETARs, destacando que no global a maior extensão de resistências neste estudo estão associadas à ETAR de Sobreiras e a Coimbra que têm na sua rede grandes unidades hospitalares. Destaca-se que as ETAR do Porto, que têm sistema terciário por UV funcional, foram as mais eficazes na desinfeção do efluente com (eficiência de desinfeção > 99.9%). Este resultado reforça a importância das tecnologias de desinfeção em ETARs para diminuição da contaminação microbiana dos cursos de água. Embora na generalidade das ETARs a carga microbiana no efluente tenha sido bastante inferior à do afluente, a análise estatística aos resultados revelou que não existiam diferenças significativas na resistência a cada agente microbiano encontrado entre as amostras de afluente, efluente e lamas.

Um estudo semelhante realizado sobre os perfis de resistência entre *Enterococcus spp.* realizado numa ETAR do norte (> 100000 habitantes), verificou que para a maioria dos antibióticos testados a prevalência de resistência aumentou no efluente tratado embora se verifique uma

redução drástica na carga microbiana (Tabela 7; (Ferreira da Silva, et al., 2006)). Neste estudo não foram detetados isolados com resistência a VAN (total de 133), e as restantes resistências eram idênticas às reportadas no estudo anterior para as ETARs do Freixo e Sobreiras (com exceção da GEN que neste estudo foi testada em concentração inferior).

Outro estudo realizado numa ETAR do norte avaliou os perfis de resistência de 3 géneros de bactérias, onde se inclui a *E. coli*, no afluente e efluente ao longo de 18 meses, em 6 campanhas de amostragem (Ferreira da Silva, et al., 2007). Neste estudo os resultados para *E. coli* indicaram que no efluente a prevalência de resistência era maior do que no afluente para a maioria dos antibióticos (Figura 18). Este estudo também estudou a suscetibilidade de bactérias resistentes a desinfetantes e metais pesados, tendo verificado que a presença de mercúrio correlacionava bem com a resistência a tetraciclina e sulfametoxazol.

Taxon	Wastewater	n	Resistance prevalence (%)								
			AML	CIP	SXT	TET	CP	GEN	R2	R3	R4
<i>Escherichia</i> spp.	Raw	159	28.0 (3.2)	2.5 (0.6)	22.2 (1.3)	32.1 (0.6)	10.5	3.8	28.3	16.4	5.0
	Treated	115	34.8 (6.3)	9.7 (0.9)	22.5	36.8	20.5	5.2	34.2	21.1	8.8
	Total	274	30.9 (3.8)	5.5 (0.6)	22.3 (0.5)	34.1 (0.2)	14.5	4.4	30.7	19.0	7.7
<i>Shigella</i> spp.	Raw	10	20.0	0.0	0.0	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	Treated	16	12.5 (6.3)	6.3	12.5	25.0	0.0	6.3	12.5	12.5	12.5
	Total	26	14.8 (7.4)	3.7	7.4	14.8	4.8	3.7	7.4	7.4	7.4
<i>Klebsiella</i> spp.	Raw	20	94.7	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0
	Treated	23	95.7	4.4	8.7	13.0	5.9	4.4	17.4	8.7	4.4
	Total	43	92.9	2.3	4.7	9.6	3.5	2.3	11.6	4.7	2.3

AML, amoxicillin; CIP, ciprofloxacin; CP, cephalothin; GEN, gentamicin; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; TET, tetracycline; R2, R3, R4, resistant to two or more, three or more and four or more antibiotics, respectively.

Figura 18. Prevalência de resistência a antibióticos de bactérias isoladas no afluente e efluente de ETAR.

Foi realizado um estudo para avaliar os padrões de resistência de *E. coli* isoladas de águas superficiais de cursos de água (não identificados) e residuais de uma ETAR da zona norte (8 campanhas) entre 2004 e 2006 (Figueira, et al., 2011). No global das amostras processadas foram estudados 460 isolados, que apresentavam resistência aos antibióticos testados SFX (78%), seguida por TET (26%), EST (24%) e β -lactâmicos (AML 24% e cefalotina 18%). Nenhum isolado era resistente a meropenem, antibiótico da classe carbapenemo. O estudo dos perfis de resistência ao nível dos diferentes filogrupos de *E. coli* permitiu identificar que os filogrupos A e B1 eram os mais abundantes e que apresentavam a menor e maior resistência, respetivamente. O tratamento da ETAR resultou num aumento significativo da prevalência de resistência a CIP e EST.

Tabela 7. Resumo da prevalência de resistências a antibióticos (%) reportadas nos estudos analisadas

Ref.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição	Género avaliado	n	AMX	AMP	PEN	CFT	ERIT	STM	GEN	TET	IMP	MRP	CIP	VAN	SXT	CLR	Clind.	Q/D
(Figueira, et al., 2011)	Norte	Várias	Superficial e ETAR	<i>E. coli</i>	460	24			18		24		26		0			78			
(Ferreira da Silva, et al., 2007)	Norte	Residual	afluente ETAR	<i>E. coli</i>	159	28			10,5			3,8	32,1			2,5		22,2			
(Ferreira da Silva, et al., 2007)	Norte	Residual	efluente ETAR	<i>E. coli</i>	115	34,8			20,5			5,2	36,8			9,7		22,5			
(Varela, et al., 2014)	Norte	Residual	Efluente hospitalar	<i>Enterobacteria</i>		52,7										15,8					
(Varela, et al., 2014)	Norte	Residual	afluente ETAR	<i>Enterobacteria</i>		45,7										3,5					
(Varela, et al., 2014)	Norte	Residual	efluente ETAR	<i>Enterobacteria</i>		46,4										5,1					
(Martins da Costa, et al., 2006)	Douro	Residual	ETAR Freixo	<i>Enterococcus spp.</i>	74		2,7			29,7		6,8	36,5			16,2	1,4				24,3
(Martins da Costa, et al., 2006)	Douro	Residual	ETAR Sobreiras	<i>Enterococcus spp.</i>	74		4,1			43,2		5,4	48,6			21,6	2,7				18,9
(Faria, et al., 2009)	Norte	Superficial	ETA (1,5 milhões pax)	<i>Staphylococcus (S. epidermidis)</i>	10					50		10	10				0			10	
(Faria, et al., 2009)	Norte	Consumo	Rede distribuição	<i>Staphylococcus (S. epidermidis)</i>	49			1,9		17,3			1,9				0			1,9	
(Faria, et al., 2009)	Norte	Consumo	Rede distribuição	<i>Staphylococcus (S. pasteurii)</i>	113			4,4		50,4			7,8				0			0,9	

Ref.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição	Género avaliado	n	AMX	AMP	PEN	CFT	ERIT	STM	GEN	TET	IMP	MRP	CIP	VAN	SXT	CLR	CLD	Q/D
(Faria, et al., 2009)	Norte	Consumo	Rede distribuição	<i>Staphylococcus (S. saprophyticus)</i>	4					25			75				0			25	
(Faria, et al., 2009)	Norte	Residual	ETAR (afluente + efluente)	<i>Staphylococcus (S. pasteurii)</i>	5												0	14,3			
(Faria, et al., 2009)	Norte	Residual	ETAR (afluente + efluente)	<i>Staphylococcus (S. saprophyticus)</i>	15			2,8		16,7		5,6	8,3							11,1	
(Ferreira da Silva, et al., 2006)	Norte	Residual	afluente ETAR (< 100k ha)	<i>Enterococcus spp.</i>	56	0				33		50	31			9	0	0			
(Ferreira da Silva, et al., 2006)	Norte	Residual	efluente ETAR (< 100k ha)	<i>Enterococcus spp.</i>	77	3				23		50	33			25	0	1			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Outono	<i>Heterotrophicos</i>	nd	38,8							1,1			2,5		0,6			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Outono	<i>Heterotrophicos</i>	nd	35,7							2,2			2		0,6			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Outono	<i>Enterobacteria</i>	nd	35,9							2,5			1,2		3,3			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Outono	<i>Enterobacteria</i>	nd	49,1							2,7			2,7		5,7			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Outono	<i>Enterococci</i>	nd	0,3							15,2			2		66,5			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Outono	<i>Enterococci</i>	nd	0,8							19			2,9		75,9			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Primavera	<i>Heterotrophicos</i>	nd	39,7							2,4			2,3		14,9			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Primavera	<i>Heterotrophicos</i>	nd	20							2			1,3		12,9			

Ref.	Zona/ Bacia	Tipologia Água	Descrição	Género avaliado	n	AMX	AMP	PEN	CFT	ERIT	STM	GEN	TET	IMP	MRP	CIP	VAN	SXT	CLR	Clind.	Q/D
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Primavera	<i>Enterobacteria</i>	nd	60,9							3,2			1,2		12,3			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Primavera	<i>Enterobacteria</i>	nd	38,3							4			1		13,6			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Afluente Primavera	<i>Enterococci</i>	nd	0,8							17,5			2,2		75,6			
(Novo, et al., 2013)	Norte	Residual	Efluente Primavera	<i>Enterococci</i>	nd	17,5							22,7			2		64,8			
(Narciso-da-Rocha, et al., 2015)	Norte	Superficial	Rio Ferreira	<i>Heterotrophicos</i>	65	70			80		50	31	10		24	19		70			
(Narciso-da-Rocha, et al., 2015)	Norte	Superficial	Rio Douro	<i>Heterotrophicos</i>	85	60			55		58	45	25		52	34		65			
(Esparrinha, 2014)	Norte	Superficial	Albufeira Crestuma	<i>E. coli</i>	8				0		11,9	3,2			0	11,5					
(Novais, et al., 2005)	Norte	Residual	Saneamento montante hospital	<i>Enterococci</i>	37		11			59	32	30	41			27	0		11		
(Novais, et al., 2005)	Norte	Residual	Saneamento jusante hospital	<i>Enterococci</i>	93		45			69	48	40	37			75	27		17		
(Novais, et al., 2005)	Norte	Superficial	Rio Douro	<i>Enterococci</i>	18		33			39	6	17	17			56	33		0		

9. CONSIDERAÇÕES

No levantamento realizado constatou-se no geral que ainda são escassos os estudos realizados para quantificação da presença de antibióticos no domínio hídrico, em particular em águas superficiais e de consumo. Esta situação deve-se essencialmente à necessidade de se recorrer a um equipamento analítico com elevada sensibilidade para se conseguir detetar e quantificar estas substâncias que existem em gamas de concentrações na ordem dos nanogramas. A disponibilidade de acesso a estes equipamentos e o custo associado a este processamento constituem entraves para que as monitorizações a estes compostos emergentes não sejam mais frequentes. Com base nos estudos reunidos pode verificar-se que existem antibióticos presentes nas águas superficiais dos rios da zona norte, tendo-se identificado em alguns estudos uma relação entre a frequência e concentração destas substâncias em locais de maior contaminação dos cursos de água. Estas concentrações são na generalidade baixas, no entanto esta presença pode colocar alguns riscos para o ambiente, como foi identificado num estudo realizado no Tejo (Gaffney, et al., 2014), e para saúde humana se esta água for captada e o tratamento não for eficaz na remoção destes contaminantes. Relativamente ao rio Ave, neste levantamento não foram identificados estudos sobre a presença de antibióticos na bacia deste rio, no entanto, um estudo caracterizou o efluente descarregado de uma ETAR neste rio, que detetou a presença de um antibiótico (CIP – 5000 ng/L).

Nos estudos avaliados sobre a presença de antibióticos nas ETARs verificou-se que os efluentes apresentam concentrações muito elevadas destas substâncias, que têm essencialmente origem no consumo de antibióticos a nível doméstico, embora também estejam presentes nos efluentes hospitalares. Constata-se que as eficiências de tratamento são reduzidas, e que os afluentes das ETARs contribuem para a contaminação dos cursos de água onde são descarregados com concentrações elevadas destas substâncias, como comprovado pelos estudos realizados a montante e jusante de pontos de descarga. Outro foco de contaminação de antibióticos têm origem nas atividades de pecuária, cujo consumo de antibióticos é o dobro do consumo humano, e que podem dar origem a escorrências ou lixiviados da fertilização de campos que contaminam os cursos de água, sem qualquer tratamento. Na zona do Ave existe grande atividade pecuária, pelo que este poderá ser um foco significativo de contaminação do rio por estes fármacos.

Verificou-se que existem inúmeros estudos realizados sobre a identificação de bactérias resistentes, que variam nos géneros de bactérias avaliadas, combinação de antibióticos selecionados, metodologias de avaliação de resistência e frequência de amostragem. Por este motivo, a sistematização e comparação dos resultados não é óbvia. Contatou-se nos estudos avaliados, que a resistência a algumas classes de antibióticos, como β -lactâmicos, é frequente em bactérias isoladas do meio hídrico. Contudo, a deteção de bactérias multirresistentes (MDR), que são bactérias resistentes a mais de 3 classes, já não são tao comuns. Este foi no entanto o caso do estudo do Ave, em que foram identificadas mais de 100 bactérias MDR do género *E. coli*, que incluíam resistência ao antibiótico imipenem. O nível de inquietação destacado neste

estudo prende-se com o facto da classe deste antibiótico em questão – classe carbapenenos - ser atualmente considerada a última alternativa terapêutica para bactérias multirresistentes. De acordo com os autores, e levantamento realizado, não existe mais nenhum reporte de bactérias *E. coli* resistentes ao imipenem em Portugal, e ainda é uma ocorrência rara no contexto Europeu (Kieffer, et al., 2016). Compreende-se assim que o facto se terem isolado bactérias *E. coli* com esta resistência no rio Ave em pelo menos dois momentos (2010 e 2015), seja uma descoberta preocupante. Refere-se, que Portugal é atualmente o 3º país europeu com maior consumo desta classe de antibióticos (2.3x superior à média EU), pelo que poderá ser esperado que a resistência microbiana a esta classe possa ser mais frequente em Portugal (DGS, 2016).

Como potenciais focos de contaminação do rio por estas bactérias MDR, são apontadas as ETARs da região que recebem efluentes domésticos e hospitalares. Vários estudos analisados neste levantamento apontam para o facto de as ETARs removerem grande parte da carga microbiana dos efluentes, no entanto verifica-se na maioria dos casos um aumento generalizado da prevalência de resistência aos antibióticos no efluente tratado. Esta situação pode dever-se à aquisição de genes de resistência durante o processo de tratamento (ocorrência de fenómenos de transferência genética devido a grande densidade microbiana), ou a um processo de seleção no tratamento que permite que as bactérias resistentes sejam favorecidas e as menos resistentes eliminadas. As ETARs são assim caracterizadas como um foco de contaminação dos cursos de água com bactérias resistentes.

Outra justificação avançada para o perfil de resistências encontrado no rio Ave, é a possibilidade de existirem no próprio rio bactérias com capacidade para produzirem esta resistência ao Imipenem. No caso particular do rio Ave, que nos anos 90 foi considerado dos mais poluídos em Portugal, é possível que alguns agentes associados a esta poluição possam induzir mecanismos de resistência. Em estudos avaliados, ficou demonstrada a correlação entre a resistência a antibióticos e a presença de metais pesados, tendo já sido demonstrado que os mecanismos de proteção acionados pelas bactérias em resposta à presença de metais são idênticos aos mecanismos de resposta a antibióticos. Esta é apenas uma hipótese que poderá justificar a razão de estas bactérias terem surgido apenas neste rio, e que poderá ser alvo de estudo.

10. REFERÊNCIAS

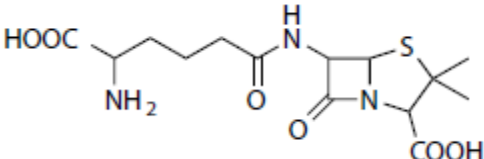
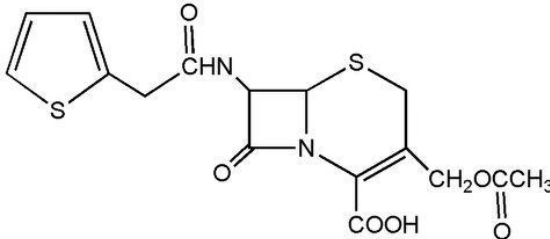
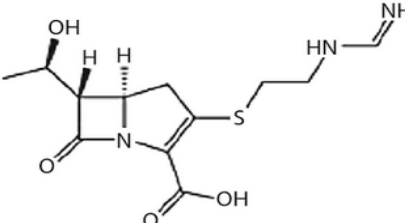
- AdDP, 2010. *Quantificação de Antibióticos nas águas de origem*, s.l.: Águas do Douro e Paiva.
- Almeida, A., 2015. *Resistência de Staphylococcus a antibióticos e metais nas águas do rio Douro*, s.l.: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Almeida, A. et al., 2014. Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal — A Ranking for Ecosurveillance. *Toxics*, pp. 188-225.
- APA, 2012. *Estudo piloto Watch List 2012*, s.l.: s.n.
- APA, 2015. *Anatomy of four pharmaceuticals in portuguese surface waters*, s.l.: s.n.
- Barbosa, M. et al., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research*, pp. 257-279.
- Barbosa, V., 2015. *Avaliação de funcionamento de duas estações de tratamento de águas residuais do interior de Vila Nova de Gaia*, s.l.: Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Berendonk, T. et al., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews*.
- Carvalho, I. & Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, pp. 736-757.
- Chandran, S. et al., 2014. Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with oqxAB gene in Escherichia coli in hospital wastewater: a matter of concern. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 984-995.
- Coates, A., Halls, G. & Hu, Y., 2011. Novel Classes of antibiotics or more of the same?. *British Journal of Pharmacology*, pp. 184-194.
- CompoundChem, 2014. *Different classes of antibiotics - an overview*. [Online] Available at: <http://www.compoundchem.com/wp-content/uploads/2014/09/A-Guide-to-Different-Classes-of-Antibiotics-Aug-15.png>
- Corcoran, J. W., Hahn, F. E., Snell, J. F. & Arora, K. L., 2012. *Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents*. s.l.: Springer Science & Business Media.
- Correia, A., 2014. *Presença de Bactérias coliformes e Escherichia coli resistentes aos antibióticos Ciprofloxacina e Estreptomicina em água natural*, s.l.: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- DGS, 2016. Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. *Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em Números – 2015*.
- Esparrinha, A., 2014. *Prevalência de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos em água natural*, s.l.: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- EU, 2003. *Regulamento (CE) nº 1789/2003 da Comissão de 11 de Setembro de 2003*. [Online] Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/ALL/?uri=CELEX%3A32003R1789>
- EU, 2015. *Decisão de Execução (EU) 2015/495 da Comissão de 20 de Março de 2015*. [Online] Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&from=PT>
- Faria, C. et al., 2009. Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water. *Science of the Total Environment*, pp. 3876-3882.
- Ferreira da Silva, M. et al., 2006. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, pp. 322-329.
- Ferreira da Silva, M. et al., 2007. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, pp. 166-176.
- Figueira, V., Serra, E. & Manaia, C., 2011. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of Escherichia coli isolated from waste- and surface waters. *Science of the Total Environment*, pp. 1017-1033.
- Figueiredo, A., 2012. *Influência de agentes antimicrobianos e ambientais nas comunidades bacterianas e nos níveis de resistência a antibióticos numa estação de tratamento de águas residuais*, s.l.: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica.
- Fischbach, M. & Walsh, C., 2009. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*, pp. 1089-1093.

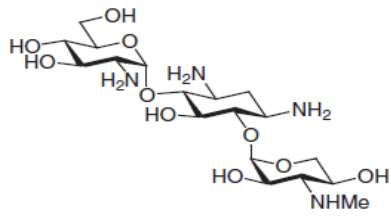
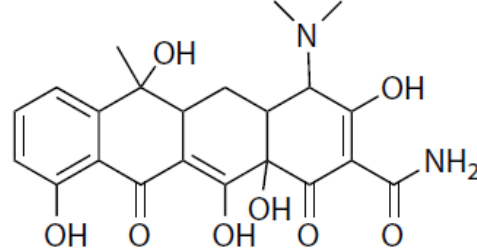
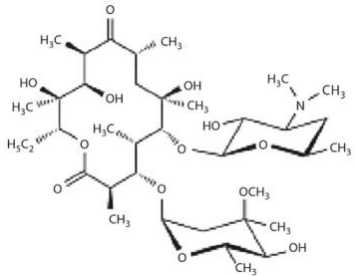
- Gaffney, V. et al., 2015. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, pp. 199-208.
- Gaffney, V., Cardoso, V., Benoliel, M. & Almeida, C., 2016. Contaminantes emergentes - fármacos: monitorização, avaliação do risco ambiental e do risco para a saúde humana. *Águas e Resíduos, APESB*, pp. 15-27.
- Gaffney, V. et al., 2014. Análise de Fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, pp. 138-149.
- Gualerzi, C. O., Brandi, L., Fabbretti, A. & Pon, C. L., 2013. *Antibiotics: targets, mechanisms and resistance*. Londres: John Wiley & Sons.
- Homem, V., Alves, A. & Santos, L., 2014. Development and Validation of a Fast Procedure To Analyze Amoxicillin in River Waters by Direct-Injection LC-MS/MS. *Journal of Chemical Education*, p. 1961-1965.
- Homem, V. & Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, pp. 2304-2347.
- Infarmed, 2013. *Prontuário Terapêutico*, s.l.: Ministério da saúde, governo de Portugal.
- Janezic, K. et al., 2013. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Untreated Surface Waters. *The Open Microbiology Journal*, 9-19.
- Kieffer, N. et al., 2016. VIM-1, VIM-34, and IMP-8 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Strains Recovered from a Portuguese River. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2585-2586.
- Korzeniewska, E., Korzeniewska, A. & M., H., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, pp. 96-102.
- Laroche, E. et al., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, pp. 118-130.
- Loureiro, R. et al., 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, pp. 77-84.
- Madureira, T. et al., 2009. Pharmaceutical trace analysis in aqueous environmental matrices by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, pp. 7033-7042.
- Madureira, T., Cruzeiro, C., Rocha, M. & Rocha, E., 2011. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal)—Experimental assessment using a zebrafish embryo test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, pp. 212-217.
- Madureira, T. V. et al., 2010. Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, pp. 5513-5520.
- Magiorakos, A. A. S. et al., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, pp. 268-281.
- Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P. & Bernardo, F., 2006. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*, pp. 1735-1740.
- Martins, M., 2012. *Monitorização de poluentes emergentes em águas brutas destinadas ao tratamento para consumo humano*. Workshop "Poluentes Emergentes no Meio Aquático: Análise, Níveis de Contaminação e Preocupações Ambientais, Águas do Noroeste.
- Martins, T., 2012. *Caracterização da virulência e dos perfis de resistência de populações microbianas patogénicas presentes no efluente final de ETAR*, s.l.: Universidade do Minho.
- Moreira, N. F. et al., 2016. Photocatalytic ozonation of urban wastewater and surface water using immobilized TiO₂ with LEDs: Micropollutants, antibiotic resistance genes and estrogenic activity. *Water Research*, pp. 10-22.
- Narciso-da-Rocha, C. & Manaia, C.-M., 2016. Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water. *Science of the Total Environment*, pp. 1-9.
- Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Valente, M. & Manaia, C., 2015. *Diversity and antibiotic resistance patterns of bacterial isolates from two rivers in Northern Portugal*. s.l., Congresso FEMS 2015.
- Novais, C. et al., 2005. Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant

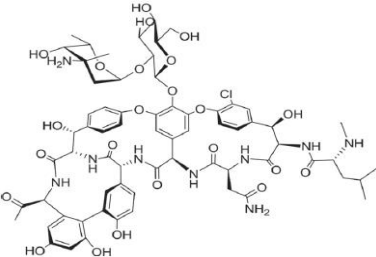
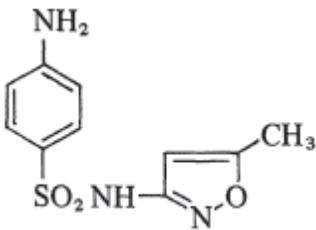
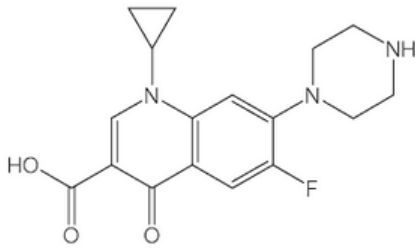
- Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 3364-3368.
- Novo, A. et al., 2013. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *water research*, pp. 1875-1887.
- OMS, 2016. Antimicrobial resistance - Fact sheet. *Organização Mundial de Saúde*.
- Paíga, P. et al., 2016. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of the Total Environment*, pp. 167-177.
- Pena, A., Chmielova, D., Lino, C. & Solich, P., 2007. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. *Journal of Separation Science*, pp. 2924-2928.
- Pereira, A. M. et al., 2015. Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment. *Environmental Research*, pp. 108-119.
- Poirel, L. et al., 2012. Environmental KPC-Producing *Escherichia coli* Isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1662-1663.
- Portugal, D., 2015. *Prevalência de bactérias resistentes a antimicrobianos em água natural*, s.l.: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Santos, L. et al., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, pp. 302-316.
- Sousa, M. et al., 2011a. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 807-822.
- Sousa, M. et al., 2011b. Efeitos do efluentes domésticos tratados e rios tributários no pool de resíduos farmacêuticos do rio Douro – Processos de mitigação. *Recursos Hídricos*.
- Sousa, M. et al., 2012. Suspended TiO₂-assisted photocatalytic degradation of emerging contaminants in a municipal WWTP effluent using a solar pilot plant with CPCs. *Chemical Engineering Journal*, pp. 301-309.
- Toxnet, 2016. *Toxicology and environmental health information program*. [Online] Available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/>
- Varela, A., André, S., Nunes, O. C. & Manaia, C. M., 2014. Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant. *Water Research*, pp. 327-336.
- Vasconcelos, A., 2015. *Estudo da qualidade da água do Rio Ave: relevância da relação entre indicadores microbiológicos, macroinvertebrados e parâmetros físico-químicos*, s.l.: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Walsh, C., 2003. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

11. ANEXOS

Tabela 8. Classes de Antibióticos

Beta-Lactâmicos	Cefalosporinas	Carbapenemes
<u>Antibióticos</u> • Penicilina; • Amoxicilina; • Meticilina; • Oxacilina; • Cloxacilina; • Dicloxacilina; • Nafcilina; • Ampicilina; • Carbenicilina; • Ticarcilina; • Mezlocilina; • Piperacilina; • Azlocilina; • Temocilina.	<u>Antibióticos</u> • 1ª geração: cefalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina; • 2ª geração: Cefamandole, cefuroxima, cefalexina, cefprozilo, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefmetazole, • 3ª geração: Cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir; • 4ª geração: cefepirome, cefepima; • 5ª geração: Ceftaroline, ceftobiprole.	<u>Antibióticos</u> • Imipenem; • Meropenem; • Doripenem.
<u>Estrutura Química</u>  ex: Penicilina	<u>Estrutura Química</u>  ex: Cefalotina	<u>Estrutura Química</u>  ex: Imipenem
<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da biossíntese da parede celular	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da biossíntese da parede celular	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da biossíntese da parede celular
<u>Notas</u> • Utilização frequente em saúde humana assim como no setor hospitalar e veterinário; • A utilização de amoxicilina é a mais frequente.	<u>Notas</u> • Utilização maioritária em Portugal na saúde humana; • Cerca de 90 % da substância ativa excretada é inalterada; • A sua degradação no ambiente é superior a pH's mais elevados.	<u>Notas</u> • Utilização principal de imipenem no sector hospitalar para infeções por multirresistentes
Referências: (Almeida, et al., 2014); (Coates, et al., 2011); (CompoundChem, 2014); (Corcoran, et al., 2012); (EU, 2003); (Gualerzi, et al., 2013); (Infarmed, 2013); (Martins, 2012);(Portugal, 2015); (Toxnet, 2016); (Walsh, 2003);		

Aminoglicosídeos <u>Antibióticos</u> • Gentamicina; • Amikacina; • Espectinomicina; • Tobramicina; • Netilmicina; • Neomicina; • Canamicina; • Estreptomicina; • Paromomicina; • Sisomicina; • Dibekacina; • Isepamicina	Tetraciclina <u>Antibióticos</u> • Tetraciclina; • Minociclina; • Doxiciclina; • Demeclociclina. • Oxitetraciclina; • Clortetraciclina; • Metaciclina; • Tigecycline	Macrolídeos <u>Antibióticos</u> • Eritromicina; • Claritromicina; • Azitromicina.
<u>Estrutura Química</u>  ex: Gentamicina A	<u>Estrutura Química</u>  ex: Tetraciclina	<u>Estrutura Química</u>  ex: Eritromicina
<u>Mecanismos de ação</u> • Interação na síntese proteica	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da síntese proteica	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da síntese proteica
<u>Notas</u> • Utilização reservada ao setor hospitalar;	<u>Notas</u> • Devido a uma maior biodisponibilidade a doxiciclina destaca-se das restantes tetraciclina.	<u>Notas</u> • Os mais utilizados na medicina humana são a azitromicina e a claritromicina; • Os antibióticos azitromicina e a claritromicina são degradados por fotólise no meio ambiente.
Referências: (Almeida, et al., 2014); (Coates, et al., 2011); (CompoundChem, 2014); (Corcoran, et al., 2012); (EU, 2003); (Gualerzi, et al., 2013); (Infarmed, 2013); (Martins, 2012);(Portugal, 2015); (Toxnet, 2016); (Walsh, 2003);		

Glicopéptideos	Sulfonamidas	Quinolonas
<u>Antibióticos</u> • Vancomicina • Teicoplanina • Telavacin	<u>Antibióticos</u> • Sulfacetamida • ácido 4- aminobenzoico; • Sulfadiazina; • Sulfathalidine • Sulfafurazole; • sulfametoxazole	<u>Antibióticos</u> • Ácido nalidíxico; • Ácido oxálico; • Norfloxacin; • pefloxacin, • Enoxacin; • Ofloxacin • Ciprofloxacina; • Temafloxacina; • Lomefloxacina; • Fleroxacin; • Grepafloxacina; • Esparfloxacina; • Trovafloxacina; • Clinafloxacina; • Moxifloxacina;
<u>Estrutura Química</u>  Ex: Vancomicina	<u>Estrutura Química</u>  Ex: Sulfametoxazole	<u>Estrutura Química</u>  Ex: Ciprofloxacina
<u>Mecanismos de ação</u> • Interferência na síntese da parede celular	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição dos caminhos metabólicos	<u>Mecanismos de ação</u> • Inibição da síntese de ácido nucleico
<u>Notas</u> • Utilização de vancomicina para infecções resistentes no setor hospitalar.	<u>Notas</u> • São considerados como a classe de antibióticos com maior mobilidade.	<u>Notas</u> • Antibióticos predominantes na medicina humana são ciprofloxacina, moxifloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacin, prulifloxacina • Maioria dos antibióticos da classe quinolonas apresentam uma grande estabilidade química, não se degradam com a temperatura e não sofrem hidrólise.
Referências: (Almeida, et al., 2014); (Coates, et al., 2011); (CompoundChem, 2014); (Corcoran, et al., 2012); (EU, 2003); (Gualerzi, et al., 2013); (Infarmed, 2013); (Martins, 2012);(Portugal, 2015); (Toxnet, 2016); (Walsh, 2003);		