DOI: 10.55905/rdelosv18.n65-102
ISSN: 1988-5245

Originals received: 2/20/2025
Acceptance for publication: 3/13/2025

Ocorrência ambiental da superbactéria *Pseudomonas aeruginosa* no Lajeado do Pardo em Frederico Westphalen - Rio Grande do Sul, Brasil

Environmental occurrence of superbacteria *Pseudomonas aeruginosa* in the Lajeado do Pardo em Frederico Westphalen - Rio Grande do Sul, Brazil

Ocurrencia ambiental de la superbacteria *Pseudomonas aeruginosa* en Lajeado do Pardo en Frederico Westphalen - Rio Grande do Sul, Brasil

Jefferson Alves da Costa Junior
Doutor em Ciências
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: jefferson.costa@ufsm.br

Arci Dirceu Wastowski
Doutor em Química
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Santa Maria – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: wastowski@ufsm.br

Cesar de Morais Coutinho
Doutor em Tecnologia de Alimentos
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: cm.coutinho@uol.com.br

Dienifer Stahlhöfer
Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: dieniferstahlhoferiff@gmail.com

Gabriel Baraldi Volpi
Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: gabrielbvolpi_189@hotmail.com

Letícia da Silva dos Santos
Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: leticia.s.santos141@gmail.com

Luisa Quatrin Oliveira
Graduanda em Farmácia
Instituição: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: brancaquatrin@gmail.com

Nilson Ferreira dos Santos
Mestrando em Ciência e Tecnologia Ambiental
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria
Endereço: Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: nilfs2005@hotmail.com

RESUMO
O surgimento de bactérias patogênicas com resistência a vários antimicrobianos tem gerado elevada preocupação no meio científico e à Organização Mundial da Saúde, pois essas bactérias, quando ocasionam infecções à saúde humana, geram doenças de difícil tratamento, podendo aumentar o número de morbidades e, até mesmo, promover o aumento no caso de óbitos, principalmente em casos de septicemia hospitalares. Dentre os fatores que contrinuem para o aumento da resistência antimicrobiana, conforme o relatório do Programa Ambiental das Nações Unidas, destacam-se: o índice de pobreza, a falta de saneamento básico, o aumento de poluentes emergentes. Neste contexto, a resistência antimicrobiana (AMR) é um tema de elevada relevância mundial, pois se não for combatida cientifica e eficazmente, poderá ocasionar uma crise global na saúde humana denominada de pan-resistência. Em estudos feitos nas águas do rio Lageado do Pardo que margeia o município de Frederico Westphalen-RS/Brasil, foram identificadas bactérias do gênero Pseudomonas com resistência múltipla aos antibióticos das classes: β-Lactâmicos, Macrolídeos e Quinolonas. A avaliação foi realizada através de antibiogramas em placa de Petri em meio Mueller-Hinton (Bauer *et al*., 1966) e analisado conforme National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2020/Br-Cast, 2023).

Palavras-chave: antibiograma, resistência antimicrobiana (AMR), extrato hidroalcoólico, pseudomonas, super-bactéria.

ABSTRACT
The emergence of pathogenic bacteria with resistance to various antimicrobials has caused great concern in scientific circles and the World Health Organization, because when these bacteria cause infections in human health, they lead to diseases that are difficult to treat and can increase the number of morbidities and even lead to an increase in the number of deaths, especially in cases of hospital septicemia. Among the factors contributing to the increase in antimicrobial resistance, according to a report by the United Nations Environmental Program, the following stand out: the poverty rate, the lack of basic sanitation, the increase in emerging pollutants. In this context, antimicrobial resistance (AMR) is a highly relevant issue worldwide, because if it is not combated scientifically and effectively, it could lead to a global crisis in human health known as pan-resistance. In studies carried out on the waters of the Lageado do Pardo river, which borders the municipality of Frederico Westphalen-RS/Brazil, bacteria from the genus Pseudomonas were identified with multiple resistance to antibiotics from the classes: β-Lactams, Macrolides and Quinolones. The evaluation was carried out using antibiograms in Petri dishes in

Mueller-Hinton medium (Bauer *et al*., 1966) and analyzed according to the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2020/Br-Cast, 2023).

Keywords: antibiogram, antimicrobial resistance (AMR), hydroalcoholic extract, pseudomonas, super-bacteria.

RESUMEN
La aparición de bacterias patógenas resistentes a diversos antimicrobiano ha causado gran preocupación entre los científicos y la Organización Mundial de la Salud, porque cuando estas bacterias causan infecciones en la salud humana, dan lugar a enfermedades difíciles de tratar y pueden aumentar el número de morbilidades e incluso provocar más muertes, sobre todo en casos de septicemia hospitalaria. Entre los factores que contribuyen al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, según un informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, se encuentran: la tasa de pobreza, la falta de saneamiento básico, el aumento de los contaminantes emergentes. En este sentido, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un tema de gran relevancia en todo el mundo, ya que si no se combate de forma científica y eficaz, podría provocar una crisis global en la salud humana conocida como panresistencia. En estudios realizados en las aguas del río Lageado do Pardo, que bordea el municipio de Frederico Westphalen-RS/Brasil, se identificaron bacterias del género Pseudomonas con resistencia múltiple a antibióticos de las clases: β-Lactámicos, Macrólidos y Quinolonas. La evaluación se realizó mediante antibiogramas en placas de Petri en medio Mueller-Hinton (Bauer *et al*, 1966) y se analizaron según el National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2020/Br-Cast, 2023).

Palabras clave: antibiograma, resistencia antimicrobiana (RAM), extracto hidroalcohólico, pseudomonas, superbacterium.

1 INTRODUÇÃO

Em termos de saúde pública, tanto no Brasil como em nível mundial, a bactéria do gênero Pseudomonas, principalmente da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, tem sido o principal agente de infecção hospitalar em casos de pneumonia, principalmente quando é utilizado o sistema de ventilação mecânica (Gales, Sader e Jones, 2002; Gaynes e Edwards, 2005). A relevância se torna maior na área da saúde quando essa espécie se torna resistente a antibióticos tradicionais que são utilizados nos tratamentos das infecções. É mister o desenvolvimento de pesquisas que permitam identificar o aparecimento de bactérias resistentes e multiressistentes aos antibióticos nos compartiementos ambientais, como a água, a fim de gerar medidas preventivas ao controle de infestações que podem gerar doenças, endemias e, até mesmo, pandemias. Ressalta-se que a água é a fonte vital das populações, assim como aos meios de

produção, como a produção agrícola (alimentos de origens vegetais e animais), razão pela qual esse estudo prezou em analizar, microbiologicamente, a qualidade da água do Lageado do Pardo, rio que margeia a área rural do município de Frederico Westphalen no Estado do Rio Grande do Sul – Brasil, servindo como fonte de água às atividades da produção agrícola, tão importantes ao desenvolvimento regional sustentável, mas também para o abastecimento da estação de tratamento de água municipal. Partindo dessa problemática, deve-se buscar soluções alternativas como na prospecção de novos compostos químicos bioativos que apresentem potencial para inibir o crescimento microbiano ou eliminá-los. Neste contexto, objetivou-se analizar, microbiologicamente, a qualidade da água no rio Lageado do Pardo, a fim de identificar bactérias com *status* de resistência aos antimicrobianos de uso tradicional na área da saúde clínica. Ainda, buscando alternativas de combate às bactérias resistentes, foi testado o extrato hidroalcoólico da planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl), visando um futuro estudo para o desenvolvimento de novos antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Conforme os dados divulgados pelo *Center for Disease control and Prevention* (CDC, 2013), a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem sido responsável por cerca de 51.000 casos de infecções, das quais 6.000 casos apresentaram multirresistência a antibióticos, impactando na área da sáude humana. As cepas de bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* têm sido encontradas resistentes às diversas classes de antibióticos que são, clinicamente, utilizados nos tratamentos de combate às infecções, geralmente apresentando resistências aos β-lactâmicos. Conforme Lazaretti *et al*., (2022), a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem apresentado resistência antibiótica, sendo um dos principais microrganismos infecciosos de pacientes imunodeprimidos e pelo aumento no número de infecções em ambientes hospitalares. Conforme o relatório do Programa Ambiental das Nações Unidas (Unep, 2023), a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos existentes, como os antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários, consiste numa das dez principais ameaças à saúde pública no mundo. Em 2019, a Resistência dos Microrganismos aos Antimicrobianos (AMR) foi responsável, direta e indiretamente, pelo número de 5 milhões de óbitos no mundo. O Brasil detém a classificação de "médio-alto" em incidência da AMR. O relatório também destaca os principais fatores, ligados

à AMR, que favorecem ao estabelecimento da resistência microbiana nos países, tais como: o índice de pobreza; a falta de saneamento básico (tratamento de água e esgotos); o aumento dos poluentes emergentes das indústrias farmacêuticas, da indústria de alimentos, da produção agricola, do tratamento de doenças de animais e de pessoas (domiciliar, clínicas e hospitais) e dos produtos secundários provenientes das indústrias químicas (desinfectantes, metais pesados, etc). Estes produtos, insumos e subprodutos, anteriormente destacados, quando dispersos nos compartimentos ambientais (ar, água, solo) e, até mesmo incorporados nos alimentos, favorecem a pressão seletiva de microrganismos aos agentes antimicrobianos, tornando-os resistentes (Hölzel, Tetens e Schwaiger 2018; Leonard *et al*. 2018; Koutsoumanis *et al*. 2021). A Organização Mundial da Saúde concluiu que a resistência antimicrobiana é um tipo de ameaça global à humanidade (Who, 2021). Vieira *et al*., (2017), Camou *et al*., (2017), relataram os fatores que propiciam o desenolvimento da resistencia microbiana, dentre os quais: prescrição de antibióticos de modo exarcebado, dosagens e tempo de uso inadequados, a não prescrição quando é necessária, automedicação, prescrição indevida de antibióticos de amplo escpectro de ação, antibióticos postos à venda no mercado sem a eficácia comprovada em todos os ensaios pré-clínicos. Conforme estudos de Zagui *et al*., 2022, deve-se destacar os sistemas de esgotos hospitalares como reservatório de resíduos de medicamentos e bactérias, que favorecem o desenvolvimento de resistencias antimicrobianas. Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento da resistência para o gênero Pseudomonas, destaca-se a estrutura da membrana externa dessas bactérias que apresenta baixa permeabilidade e capacidade de suportar temperaturas próximas à 43ºC, sendo que a temperatura ótima de seu crescimento está na faixa entre 36º- 40º C (Bender *et al*., 2015); os autores, ainda, relacionaram a capacidade de resistência aos antibióticos com as cores características das colônias de *Pseudomonas,* quando cultivadas em laboratório, devido a produção de pigmentos por esse microrganismo. Destacaram-se as colorações: amarelo (fluoresceína) e azul (piocianina) que por combinação originam a cor verde (pioverdina) que é uma característica desse gênero quando cultivado em determinados meios de culturas. Contudo, conforme Murray *et. al*., (2014), o gênero *Pseudomonas* também pode produzir o pigmento vermelho (piorrubina) e o pigmento acastanhado à preto (piomelanina). Em trabalhos de Almeida-Paes, *et al*., (2009), Silva, *et al*., (2010), Carvalho, *et al*., (2016), comprovaram que compostos fenólicos de plantas e os pigmentos microbianos, como a piomelanina, possuem ações anti-radicais livres conferindo proteção à bactéria *Pseudomonas*

contra às radiações na faixa do ultra-violeta, gerando maior resistência desses microrganismos aos estresses oxidativos e aos agentes físicoquímicos de controle, como aos antibióticos. Tais compostos químicos, também apresentaram efeito citotóxico às céluas cancerosas (Santos, *et al*., 2022). Quanto a resistência e prevalência do gênero Pseudomonas em tratamentos clínicos, Basso *et al*., (2016), Debarba *et al*., (2017), comprovaram a múltipla resistência dessa bactéria aos antibióticos usuais no tratamento de pacientes com infecções hospitalares. De modo geral, a tabela 1, apresenta a descrição dos principais antibóticos utilizados nos tratamentos de infecções microbianas e os seus efeitos no metabolismo das bactérias (Trabulsi, *et al*., 2015).

Tabela 1 – Antibióticos: classes e mecanismos de ação no metabolismo microbiano

Mecanismo de Ação		**Antibióticos**
- interfere na estrutura e biossíntese da parede celular		Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicinas
- interfere na permeabilidade e na estrutura da membrana celular		Polimixinas
- interfere na biossíntese proteica		Tetraciclina, Eritromicina, Cloranfenicol, Amicacina
- interfere na estrutura dos ácidos nucléicos (DNA)		Sulfonamidas, Trimetoprima, Quinolonas
- interfere na estrutura do RNA-ribossômico		Macrolídeos
Classes		
	β – lactâmico	Penicilinas, Cefalosporinas
Aminoglicosídeos		Amicacina, Tobramicina, estreptomicina, gentamicina
Cefalosporina de 4ª g.		Cefepime (4ª geração)
Tetraciclinas		Tetraciclina
Macrocíclicos		Rifampicina, rifaximina
Macrolídeos		Eritromicina, Azitromicina
Polipeptídeos		Polimixina, bacitracina
Anfenicol		Cloranfenicol
Quinolonas, Ác. Nalidíxico, Fluoroquinolonas		Ciprofloxacino, Delafloxacino, Gemifloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Norfloxacino.
Sulfonamidas		Sulfametizol, sulfisoxazol, sulfasalazina
Trimetoprim		Trimetoprima (sintético)
Nitroimidazólico		Metronidazol
Espectro de ação	**L**argo (amplo)	Quinolonas, Tetraciclinas
Baixo		Penicilina, aminoglicosídeos
Intermediário		Ampicilina, amoxilina
Efeito na bactéria	**Bactericida**	Quinolonas, Penicilina
Bacteriostático		Tetraciclina.

Fonte: Modificado de Trabulsi, *et.al*., 2015

Conforme Jacoby e Munoz (2005), os mecanismos de resistências desenvolvidos pela bactéria do gênero *Pseudomonas*, nas principais classes de antibióticos, seriam: a)

Cefalosporinas: síntese de cefalosporinases; b) Inibidores de betalactamases: hiperprodução de betalactamases modificadas; c) Carbapenêmicos: Síntese de Enzimas metalo-zinco e betalactamases; d) Quinolonas: mecanismos de efluxo e sintese de topoisomerases modificadas; e) Aminoglicosídeos: sintese de enzimas aminoglicosidases.

Neste relevante contexto, com o desenvolvimento da biotecnologia e com a prospecção de plantas da flora brasileira à síntese de fitoquímicos, tem sido possível gerar novos produtos com ação antimicrobiana em benefício da saúde humana, animal e vegetal. Segundo os estudos de Pagano e Maria (2010), o Brasil possui importantes biomas em seu extenso território nacional, apresenta uma rica biodiversidade vegetal com cerca de 120.000 espécies, evidenciando-se o potencial científico para a prospecção e ao desenvolvimento de novos princípios ativos medicinais à formulação de novos fármacos, novos medicamentos, como os antimicrobianos. Desta forma, as plantas possuem substâncias bioativas do metabolismo secundário com atividades anti-oxidativas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, tais como os flavonoides, compostos fenólicos, carotenóides, vitaminas, ácidos graxos, óleos essenciais e diversos outros compostos a serem pesquisados para o uso em diversas terapêuticas, como, neste estudo, a planta da espécie *Tithonia diversifolia* (Hemsl), conhecida como Mão-de-deus, a qual possui propriedades químicas com ações antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiarréica, antiamoébica, antiglicêmica. Os objetivos da presente pesquisa foram isolar bactérias do gênero *Pseudomonas* em amostras de água, coletadas do rio Lageado do Pardo, na região do município de Frederico Westphalen e verificar a sensibilidade e a resistência dessa bactéria aos antibióticos tradicionalmente utilizados nos tratamentos de doenças infecciosas, bem como testar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da planta Mão-de-deus que foi encontrada na flora brasileira.

3 METODOLOGIA

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia do Bloco 7 da Universidade Federal de Santa Maria - Campus Frederico Westphalen. O desenvolvimento dos trabalhos ocorreram nas seguintes etapas: a) Coleta de amostras de água do rio Lajeado do Pardo - coordenadas 27º22'242"S e longitude 53º25'439"W - Frederico Westphalen-RS, filtradas em membrana de celulose e inoculadas em meio CN-Agar em incubadora biológica (Solid

Stell/SSBI 42L) na temperatura de 37-38ºC por 24 horas (CEN, 2008); b) Isolamento de bactérias do gênero *Pseudomonas* em meio seletivo e diferencial Cetrimida Agar Base/CN-Agar (cetrimida e ácido nalidíxico (0,015g/L), incubadas em temperaturas de 41-42ºC, adaptado da ISO 16266:2008/CEN (European Committe for Standard, 2008); c) Técnica de Gram e observação microscópica; d) Testes bioquímicos: Lactose (meio agar MacConkey), Catalase (teste do peróxido de hidrogênio), Citrato (meio agar Citrato Simons), Manitol (meio agar Manitol), Oxidase (Cloridrato de Tetrametil-p-fenilenodiamina a 1%), *Pseudalert* (IDEXX) - ISO 16266-2:2018/APHA (2017), EATON, *et al.*, 2000; e) Preparo dos extratos hidroalcoólicos, conforme a metodologia de Dodiya e Amin (2015), com algumas modificações, utilizou-se as partes aéreas (folhas) da planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl), conhecida vulgarmente como Mão-de-deus; f) Teste e Análise de Antibiograma (TSA), CLSI, 2020, Br-CAST, 2023, método de disco de difusão, Kirby-Bauer (LABORCLIN, 2011), em triplicata, em placas de Petri com meio ágar Mueller-Hinton, contendo os discos de antibióticos: Azitromicina - 15µg (Macrolideo); Amicacina - 30µg, Tobramicina - 10µg (Aminoglicosideos); Cefepime - 30µg (β-Lactâmico); Ciprofloxacina - 5µg (Quinolona) e extrato hidroalcoólico da planta denominada Mão-de-deus (*Tithonia diversifolia*), na concentração principal de 500µg/mL, com variações de 100 a 500µg/mL, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009 and 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As amostras de água inoculadas em meios seletivos e diferenciais, em condições ótimas para o crescimento de bactérias do gênero Pseudomonas, revelaram o surgimento de sideróforos fluorescentes de pigmentação amarela-esverdeada (piocianina e pioverdina) e azulada em câmara de UV (*pseudalert*) em meios líquidos e sólidos com colônias arredondadas e translúcidas.

As observações de microscopia óptica das colônias, pelo desenvolvimento da técnica de coloração de Gram, confirmaram as características da forma de bastonetes e a coloração avermelhada das bactérias, comprovando o *status* de bactéria Gram negativa (Figura 1).

Figura 1. Observação microscópica das bactérias Pseudomonas pela técnica de Gram, (aumento 100 x10)

Fonte: elaborado pelos autores, 2024

Para confirmar o gênero e a espécie das bactérias isoladas nas amostras de água, crescidas em meio seletivo à temperatura de 42ºC, presumível do gênero Pseudomonas, as bactérias foram testadas bioquimicamente com resultados positivos em meio rápido *Pseudalert* (apresentou a fluorescência azul quando submetido à radiação UV), também positivos para catalase, citrato e oxidase, em consonância aos trabalhos de Richard *et al*., 2011, mas com resultados negativos para os testes de fermentação da lactose e manitol (apresentados na Tabela 2).

Tabela 2. Testagem bioquímica dos microrganismos selecionados para identificação da espécie *P.aeruginosa*

Microrganismo	**Lactose**	**Catalase**	**Citrato**	**Manitol**	**Oxidase**
Pseudomonas	-	+	+	-	+

Fonte: elaborado pelos autores, 2024

Na figura 2 (a-d) são apresentas as imagens do material vegetal e do processo de elaboração do extrato hidroalcoólico através das partes aéreas (folhas) da planta Mão-de-deus (*Tithonia diversifolia*).

Figura 2. Elaboração e obtenção do extrato vegetal da espécie *Tithonia diversifolia*.

a) Mão-de-deus b) Percoladores c) Vaporizador rotativo d) Extrato

Fonte: elaborado pelos autores, 2024.

Realizou-se o teste de antibiograma para as bactérias da espécie identificada, *Pseudomonas aeruginosa*, adicionando-se aos meios os discos de difusão contendo antibióticos tradicionais e o extrato hidroalcólico; após o período de incubação, verificou-se a formação e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento nas placas de Petri cultivadas. A tabela 3 apresenta os dados referente aos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das colônias das bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, tanto para os antibióticos testados como para o extrato hidroalcoólico da espécie vegetal.

Tabela 3. Resultado da ação inibitória do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* pelos antibióticos tradicionais e pelo extrato vegetal hidroalcoólico (diâmetro do halo de inibição em milímetros).

Antibióticos e Extrato Vegetal	**Repetição 1 Diâmetro (mm)**	**Repetição 2 Diâmetro (mm)**	**Repetição 3 Diâmetro (mm)**	**Média Diâmetro (mm)**	**[1]Resistência Diâmetro (mm)**
Amicacina (30µg)	22	23	22	**22,33**	**<15**
Tobramicina (10µg)	21	21	21	**21**	**< 18**
Azitromicina (15µg)	12	11	11	**11,33**	**<18**
Cefepime (30µg)	18	18	17	**17,66**	**< 21**
Ciprofloxacina (5µg)	19	18	19	**18,66**	**<26**
Extrato (500µg) *Tithonia diversifolia*	22,2	22,3	22,3	**22,26**	**[2]NI**

[1]Base na Tabela de pontos de corte do BR-Cast, 2023.
[2]NI = não informado.
Fonte: elaborado pelos autores, 2024.

Os resultados das analises de antibiograma das cepas de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* comprovaram a sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos Amicacina e Tobramicina que pertencem a classe dos aminoglicosídeos. Contudo, as cepas se mostraram resistentes aos antibióticos: Cefepime (β-Lactâmico, cefalosporina de 4ªgeração), Azitromicina (Macrolídeo) e ao antibiótico Ciprofloxacino da classe das Quinolonas. Comparativamente aos diâmetros dos halos dos antibióticos utilizados, o extrato hidroalcoólico da planta da espécie *Tithonia diversifolia* (Mão-de-deus) apresentou um halo médio de 22,26mm ao redor do disco de difusão, com efeito de inibição do crescimento das bactérias similar aos antibióticos Amicacina e Tobramicina (aminoglicosídeos), mostrando indícios de que o extrato hidroalcoólico dessa planta deve conter substâncias antibióticas (bactericidas ou bacteriostáticas) que são capazes de inibir a atividade microbiana das bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. As imagens dos halos de inibição do crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, devido ao extrato hidroalcoólico da planta Mão-de deus, em placa de Petri, estão apresentadas na figura 3.

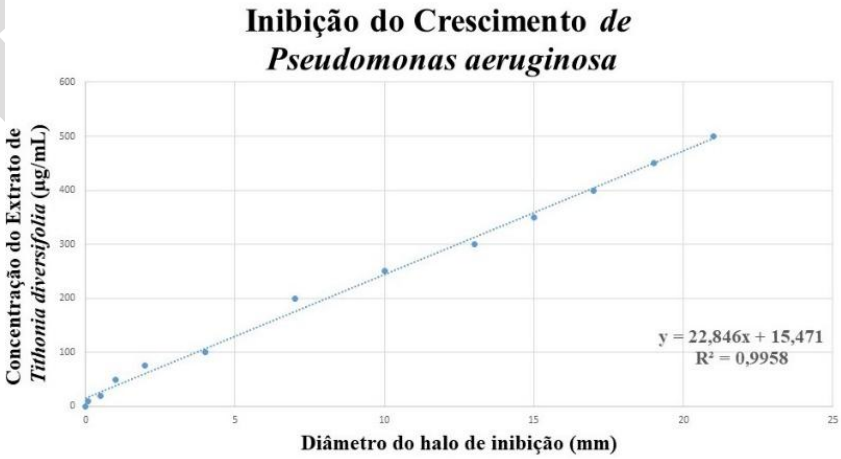
Figura 3. a) Halo de inibição do crescimento da *P. aeruginosa*, em placas de meio Mueller Hinton, devido às substâncias antimicrobianas contidas no extrato da planta *Tithonia diversifolia*; b) medida do diâmetro do halo.

a) Halo de inibição em placa **b)** Diâmetro do halo de inibição de 22,3mm.

Fonte: elaborado pelos autores

A título ilustrativo, foi elaborada a curva de inibição do crescimento microbiano para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando-se as concentrações de 100, 250, 300 e 500µg/mL do extrato hidroalcoólico da planta Mão-de-deus, servindo como base para um modelo matemático presuntivo do poder inibitório das substâncias fitoquímicas presentes nesta espécie vegetal, conforme está apresentado na figura 4.

Figura 4. Gráfico da relação entre concentrações de extrato de *Tithonia diversifolia* e diâmetros de halos de inibição com linhas de tendência.



Fonte: elaborado pelos autores, 2024.

Essa pesquisa de prospecção microbiana, no habitat da bacia do Lajedo do Pardo, confirmou a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas*, nessa região que sofre a interferência humana pelas atividades antrópicas, principalmente pelas atividades agrícolas de criação de suínos, de aves e de bovinos. Ressalta-se que essas águas também são usadas para a irrigação de

lavouras, para a produção animal e, até mesmo, para o uso humano doméstico nas áreas rurais. Além disso, as águas do Lajeado do Pardo servem para abastecer o sistema de captação da estação de tratamento de águas do município de Frederico Westphalen. Como a bactéria *Pseudomonas* está associada a doenças infecciosas, destacou-se a hipótese dessas bactérias apresentarem alguma resistência aos antibióticos testados, o que aumentaria a preocupação na área da saúde deste município, bem como aos gestores municipais e aos pesquisadores, quanto as possíveis futuras infeções ocasionadas pela bactéria do gênero *Pseudomonas* na população, o que impactaria na área da saúde pública brasileira, uma vez que as bactérias resistentes dificultam a cura de enfermidades, podendo levar as pessoas doentes a complicações no tratamento, ocasionar morbidades e, até mesmo, ocasionar óbitos, corroborando com a afirmativa de Lazaretti *et al*., (2022) de que "as infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* são muito difíceis de serem tratadas". As análises bioquímicas e o teste de Gram, comprovaram a espécie da bacteria que foi isolada das águas do Lajeado do Pardo, sendo identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. As análises de susceptibilidade e resistência das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* pelo teste de antibiograma para os cinco antibióticos utilizados: Amicacina, Tobramicina, Azitromicina, Cefepime, Ciprofloxacino, revelaram que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa,* isoladas das amostras de água do Lageado do Pardo, apresentaram sensibilidade aos dois antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. Da mesma forma, Santos, 2019, já havia destacado a importância e a eficiência dos aminoglicosídeos (Amicacina, Tobramicina) no tratamento clínico contra doenças ocasionadas por bactérias Gram negativas, como as do gênero *Pseudomonas*, eficiência que foi comprovada, neste trabalho, até mesmo às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* denominadas resistentes. Os antibióticos Amicacina e Tobramicina apresentaram o maior diâmetro de halo de inibição do crescimento nas bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* quando se comparou aos demais diâmetros de halos de inibição dos antibióticos testados. Contudo, essas bactérias apresentaram resistência aos antibióticos das classes: macrolídeos, quinolona e β-Lactâmico (Cefalosporina de 4ª geração). Logo, os antibióticos Azitromicina, Ciprofloxacino e Cefepime, nas concentrações testadas, demonstraram ineficácia no combate às bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa,* configurando essa espécie bacteriana resistente a mais de dois antibióticos e classes e, portanto, sendo considerada uma espécie que apresenta Múltipla Resistência Microbiana (RAM), ou seja, sendo caracterizada como uma "superbactéria". Neste contexto, a resistência da bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ao antibiótico

Cefepime já havia sido registrado por Akhabue (2011), assim como por Figueiredo (2007) quando relataram que mais de 50% das cepas testadas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resistência ao Cefepime. Este *status* de superbactéria à espécie de *Pseudomonas aeruginosa*, encontrada nas águas da bacia do rio Lajeado do Pardo que seguirão ao Sistema de Tratatamento das Águas (STA), serve como um alerta aos gestores municipais, tanto do município de Frederico Westphalen como de outras regiões vizinhas, neste estado do Rio Grande do Sul. Da mesma forma, são informações importantes aos agentes do sistema de saúde, pois servem como indicativos que o uso de alguns antibióticos, em tratamentos clínicos, poderá apresentar efeito insatisfatório no combate dessa espécie de bactéria, podendo comprometer todo o processo de tratamento de doenças causadas pela *Pseudomonas aeruginosa*, caso estas doenças forem causadas por agentes infecciosos com o *status* de superbactéria.

Concernente ao teste de antibiograma na bactéria Pseudomonas, realizado com o extrato hidroalcoólico da planta Mão-de-deus, pode-se comprovar que esta planta apresenta substâncias fitoquímicas capazes de inibir o crescimento microbiano da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, pois foi possível visualizar halos de inibição com diâmetro significativo, ao redor do disco de difusão que continha o extrato hidroalcoólico da planta *Tithonia diversifolia*. Portanto, o extrato hidroalcólico da planta Mão-de-deus apresentou indicativos da presença de fitoquímicos promissores para o tratamento de infecções causadas por bactérias do gênero *Pseudomonas* e, talvez, sirva contra outras bactérias.

5 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa, constatou-se que, a partir das amostras de água coletadas do Lajeado do Pardo e da incubação das membranas filtrantes em meios seletivos e diferenciais, foi possível realizar o cultivo da bactéria do gênero *Pseudomonas* e o seu isolamento, através da técnica de esgotamento de inóculo. Após o isolamento, foi identificada a espécie bacteriana pelos testes bioquímicos (*pseudalert*, catalase, lactose, manitol, oxidase, citrato e a produção de pigmentos), sendo também confirmado o *status* de bactéria ¨Gram negativa¨ pela técnica do teste de Gram. Os ensaios de sensibilidade e resistência para a *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos Amicacina, Tobramicina, Azitromicina, Cefepime, Ciprofloxacino, assim como para o extrato vegetal da planta Mão-de-deus, foram realizados em meio àgar Mueller-Hinton

para a verificação do halo de inibição de crescimento das bactérias, comparativamente as tabelas *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – BrCAST (2023) e EUCAST (2008), sendo possível observar e medir os diâmetros dos halos de inibição formados no meio de cultivo, a partir dos discos de difusão, contendo tanto os antibióticos testados, como o extrato vegetal elaborado. Em relação aos halos de inibição do crescimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, percebeu-se a sensibilidade destas bactérias, apenas aos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos: Amicacina e Tobramicina, eficácia de ação antimicrobiana; enquanto que as bactérias se mostraram resistentes para os antibióticos Azitromicina, Cefepime e Ciprofloxacino, das classes macrolídeo, β-Lactâmico e quinolona, respectivamente. No que diz respeito ao extrato hidroalcoólico elaborado da planta Mão-de-deus (*Tithonia diversifolia*), quando presente no disco de difusão nas concentrações testadas, resultou na formação de halos de inibição significativos e promissores para maiores investigações, visando o desenvolvimento de um novo produto antibiótico de base vegetal. Portanto, como perspectivas de trabalhos futuros, novas investigações deverão ser realizadas, levando-se em consideração as concentrações do extrato de *Tithonia diversifolia* para a definição do MIC à *Pseudomonas aeruginosa;* também poderão ser realizadas: análises genéticas da super-bactéria para a identificação de fatores de resistência e virulência; análises cromatográficas do extrato de *Tithonia diversifolia* para a identificção de compostos fitoquímicos de ação antimicrobiana e, posteriormente, analises de citotoxicidade dos compostos fitoquímicos da planta *Tithonia diversifolia.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; ao Ministério da Educação, Brasil; à Universidade Federal de Santa Maria – RS, BR.

REFERÊNCIAS

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** (23rd ed.). Washington DC: American Public Health Association, 2017.

AKHABUE E., SYNNESTVEDT M., WEINER M.G., BILKER W.B., LAUTENBACH E. Cefepime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Emerg. Infectious Diseases**.17(6):1037-43, 2011.

ALMEIDA-PAES, R., FRASES, S., FIALHO MONTEIRO, P.C, GUTIERREZ-GALHARDO, M.C., ZANCOPE OLIVEIRA, R.M., NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical Sporothrix schenckii isolates. **Microbes and infection**/Institut Pasteur. Apr;11(5):554–62, 2009.

BASSO, M. E., PULCINELLI, R. S. R., AQUINO, A.R. C., SANTOS, K. F. Prevalência de infecções bacterianas em pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva (UTI). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 48(4), 383-8, 2016.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M.M., SHERRIS, J. C., & TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, p. 45:493–496, 1966.

BENDER K., BUCKLEY D., MADIGAN M., MARTINHO, J., STAHL D. Brock biology of microorganisms. 14th ed. **Pearson Education**, Inc., United States of America, 2015.

BR-CAST. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Tabelas de CQ BrCAST-EUCAST v. 13.1 de 13-03-2023. Disponível em*:* https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2023/03/Tabela-CQ-de-Rotina-e-Estendido-BrCAST-15-03-2023.pdf. Acessado em 23/05-2024.

CAMOU, T., ZUNINO, P., HORTAL, M. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. **Revista Médica del Uruguay**. 33(4), 104-127, 2017.

CARVALHO, K. S. *et al*. Toxicological evaluation of essential oil the leaves of *Croton tetradenius* (Euphorbiaceae) on *Aedes aegypti* and *Mus musculus.* **Parasitology Research**., Bahia, v. 115, n. 9, p. 3441-3448, mai. 2016.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. **Threat Report**, 2013. Disponível em: http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html **.** Acessado em 25/03/2024.

CEN. European Committee for Standardization - ISO 16266:2008 (Ed.1) - Water quality - Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. **Method by membrane filtration**. Reino Unido, British Standards Institution (ISBN 978 0 580 59736 7), UK, 2008.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, **CLSI document M02-A10**, 2009.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440066-9 (Print);

ISBN 978-1-68440-067-6 (Eletronic). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pensylvania 19087 USA, 2020.

DEBARBA, E., SILVERO, K. S. V., TEIXEIRA, J. J. V., SILVA, C. M., PEDER, L. D. Prevalência microbiana em secreções traqueais de pacientes em unidade de terapia intensiva - Experiência de 4 anos [ahead of print]. ***Journal of Infection Control***. 7(1), 14, 2017.

DODIYA, B., AMIN, B. Antibacterial activity and phytochemical screening of different parts of Moringa oleifera against selected gram positive and gram-negative bacteria. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, p. 421-425, 2015.

EATON, A. D. *et al*. **Standard methods for examination of water and wastewater**, 20th Ed., American Public Health Association, Washington DC, 2000.

EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 6, no. 9, pp. 503-508, 2008.

FIGUEIREDO, E.A.P., RAMOS, H., MACIEL, M.A.V., VILAR, M. DO C.M., LOUREIRO, N.G., PEREIRA. R.G. Pseudomonas aeruginosa: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife-PE. **Rev. Brasileira de Terapia Intensiva**.19(4):421-7, 2007.

GALES, A.C., SADER, H.S., JONES, R.N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurence and antimicrobial susceptibility profile: results from SENTRY-Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, New York, v.44, p. 301-311, 2002.

GAYNES, R., EDWARDS, J.R. National Nosocomial Infections Surveilance System. Overview of nososcomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v.41, p.848-854, 2005.

HÖLZEL, C.S., TETENS, J.L., SCHWAIGER, K. Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. **Food borne Pathogens and Disease** 15(11), 671–688, 2018.

ISO 16266:2008 – European Standard, 2008. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – **Method by membrane filtration**. 1st edition, 2008.

JACOBY, G.A., MUNOZ, P. Review article: Mechanisms of disease the new βeta-Lactamases. **New England Journal of Medicine**. 352:380-91, 2005.

KOUTSOUMANIS, K., ALLENDE, A., ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A., BOLTON, D., BOVER-CID, S., CHEMALY, M. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **European Food Safety Authority Journal**: 19(6), 2021.

LABORCLIN. **Manual para Antibiograma** - Difusão em Disco (Kirby & Bauer). Trabalho elaborado pela equipe do setor Técnico da Laborclin destinado à orientação para execução do antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer. Rev: 05. p. 29. 2011.

LAZARETTI, A. *et al*. Resistência da bactéria Pseudomonas aeruginosa aos antibióticos carbapenêmicos. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, p. 10-19. 2022.

LEONARD, A.F.C., ZHANG, L., BALFOUR, A.J., GARSIDE, R., HAWKEY, P.M., MURRAY, A.K. Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant E. coli in UK coastal water users: environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (beach bum survey). **Environment International**: 114, 326–333, 2018.

MURRAY P., ROSEHTHAL K., PFALLER A. Acinetobacter, Pseudomonas e Bactérias relacionadas. **Microbiologia Médica** 7ª ed., p. 386-388, Rio de Janeiro:Elsevier, 2014.

PAGANO, M. C., MARIA, S. M. Effect of phosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of Zeyheria tuberculosa a native species in Brazil's forest. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 6, n. 6, p. 604-611, 2010.

RICHARD, D., BARTFAI, R., VOLZ, J., RALPH, S.A, MULLER S., STUNNENBERG, H.G., COWMAN, A.F. A genome-wide chromatin-associated nuclear peroxiredoxin from the malaria parasite Plasmodium falciparum. **J. Biol. Chem**. 286(13):11746–11755, 2011.

SANTOS, P.H.D. **Caracterização Molecular de Isolado Clínicos de Pseudomonas aeruginosa não Sensíveis à Amicacina e Meropenem Provenientes de Infecções de Corrente Sanguínea e de Trato Respiratório obtidos de Hospitais Brasileiros**. (2019). Dissertação (Mestrado) – Infectologia - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2019.

SANTOS, A.L.C., FERREIRA, A.C.A., FIGUEIREDO, J.R. Uso potencial de pigmentos bacterianos como drogas anticâncer e toxicidade reprodutiva feminina: uma revisão. **Ciência Animal Brasileira**, v 23, 2022.

SILVA, M.L.C., COSTA, R.S., SANTANA, A.S., KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOARES, C. I. P. **Identificação e Diferenciação de Pseudomonas aeruginosa na Água, Superfícies e Equipamentos de Piscinas**. (2018). Dissertação (Mestrado) - Microbiologia Aplicada - Universidade de Lisboa, 2018.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo, 6ª ed. 2015.

UNEP. United Nations Environment Programme. **Bracing for Superbugs Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance**. Job number: DTI/2504/GE, 2023. Disponível in: https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action. Acessado em 28/09/2024.

VIEIRA, P. N., VIEIRA, S. L.V. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. **Arq. Cienc. Saúde**, UNIPAR. 21(3), 209-212, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and use surveillance system** (GLASS) report: 2021.

ZAGUI, G.S., TONANI, K.A.A., FREGONESI, B.M., MACHADO, G.P., SILVA, T.V., ANDRADE, L.N., ANDRADE, D., SEGURA-MUNOZA, S.I. Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing MDR phenotype in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2022, vol. 82, e234471, 2022.