



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



JESSICA VIEIRA DANTAS

**VERIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Pseudomonas aeruginosa EXPOSTOS A ANTIMICROBIANOS DE USO
VETERINÁRIO**

JOÃO PESSOA

2024

JESSICA VIEIRA DANTAS

VERIFICAÇÃO DA VARIAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* EXPOSTOS A ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

JOÃO PESSOA

2024

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

ATA Nº 2/2024 - CBIOTEC - DB (18.62)

Nº do Protocolo: 23074.021785/2024-71

João Pessoa-PB, 18 de Março de 2024

Ata da 44ª (quadragésima quarta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia **JÉSSICA VIEIRA DANTAS** candidata ao Título de “Mestre” em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Às quinze horas (15h00) do dia 15 de março do ano de dois mil e vinte e quatro (15/03/2024), na sala de aulas 02 (dois) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB), reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Jéssica Vieira Dantas** candidata ao Título de “MESTRA” em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Orientador) (Universidade Federal da Paraíba); Sildivane Valcácia Silva (Examinador interno) (Universidade Federal da Paraíba) e Carlos Augusto de Oliveira Junior (Examinador externo) (Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Jéssica Vieira Dantas**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Verificação da variação fenotípica de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a antimicrobianos de uso veterinário**”. Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a Comissão em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADA. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se a examinada **Jéssica Vieira Dantas** legalmente habilitada a receber o Título de “MESTRA” em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

(Assinado digitalmente em 18/03/2024 15:56)

CARLOS AUGUSTO DE OLIVEIRA JÚNIOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

Matrícula: 1129955

(Assinado digitalmente em 18/03/2024 10:47)

SILDIVANE VALCACIA SILVA PROFESSOR DO
MAGISTERIO SUPERIOR

Matrícula: 1652922

(Assinado digitalmente em 18/03/2024 09:26)

TANIA MARIA ALVES DE ARAUJO SECRETARIO

Matrícula: 336203

(Assinado digitalmente em 19/03/2024 07:01)

ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

Matrícula: 2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **2**, ano: **2024**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **18/03/2024** e o código de verificação: **bfb170efdb**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192v Dantas, Jessica Vieira.

Verificação da variação fenotípica de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a antimicrobianos de uso veterinário. / Jessica Vieira Dantas. - João Pessoa, 2024.

86 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Bactéria Gram-negativa - *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Florfenicol. 3. Adesão celular. 4. Biofilme. I.
Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Título.

UFPB/BC

CDU 579.84(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo presente da vida e pela coragem em enfrentar tudo o que passei nos últimos dois anos, não apenas durante o mestrado, mas também nos aspectos profissionais e pessoais. Foi uma batalha que venci, e hoje estou aqui, para mais uma conquista em minha vida.

A minha família, que representa minha fortaleza e sustentáculo, tem sido uma constante fonte de apoio e estímulo ao longo da minha jornada em busca de conhecimento e desenvolvimento pessoal. Desejo ressaltar especialmente o papel da minha mãe, Edênia, que jamais desistiu de nós e da nossa educação. É graças a ela que mais esta conquista se tornou possível. À minha família, dedico uma profunda expressão de gratidão.

Expresso minha profunda gratidão a Ingridt (irmã), que é para mim o maior exemplo de coragem, inteligência, diligência e dedicação ao conhecimento. Ela nunca cessou em sua busca por ele e testemunhar suas conquistas é verdadeiramente inspirador. Além disso, sou imensamente grata por ela nunca poupar esforços para proporcionar-me a oportunidade de viver todas essas experiências enriquecedoras.

De todo o meu coração, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus colegas de mestrado, Andrwey Viana, Alex Rique, e também a Camilla Farias. Esta jornada teria sido completamente diferente sem o caloroso acolhimento que vocês me proporcionaram. Desde o início, fui recebido por vocês com amor e generosidade, e isso fez uma diferença imensa em minha vida.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão ao meu estimado orientador Ulrich, por todo o apoio, sabedoria, dedicação e paciência demonstrados não apenas comigo, mas também diante de todas as minhas inseguranças e falhas ao longo desta jornada. Sua acolhida calorosa e sua inspiração científica foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão a todos os envolvidos no programa de pós-graduação em Biotecnologia, bem como aos respeitados docentes que generosamente contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento acadêmico. Quero, especialmente, destacar a querida Sildivane Valcácia, cujo acolhimento, palavras e ensinamentos foram de valor inestimável para mim ao longo desta jornada.

Sou imensamente grata a todos os colegas do LAMA - Hueliton, Gustavo, João Bandeira e Nael - que me apoiaram durante a realização deste trabalho, assim como aos

colegas do Labra e do Labora. Suas valiosas contribuições e parcerias foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

Expresso minha imensa gratidão a todos os meus amigos do IFPB, assim como aos meus queridos amigos e amigas de Pombal que torceram, incentivaram e estiveram ao meu lado. Desejo agradecer à minha tia Aparecida Dantas, por abrir as portas de sua casa e me oferecer apoio durante toda esta jornada. Suas palavras de incentivo e seu constante apoio foram de grande valia para o esse processo.

Agradeço profundamente ao IFPB – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, pelo apoio concedido e pela liberação que possibilitou minha dedicação exclusiva ao mestrado. Sinto uma gratidão eterna por essa instituição da qual me orgulho em fazer parte.

Expresso também minha sincera gratidão à banca examinadora pelo tempo e pela disposição, dedicados à discussão e aos aprimoramentos do trabalho. Suas valiosas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

“Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes”.

(Paulo Freire)

DANTAS, Jéssica Vieira. Verificação da variação fenotípica de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a antimicrobianos de uso veterinário. João Pessoa, 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2024

RESUMO

A perspectiva *One Health* reconhece a interligação entre saúde humana, animal e ambiental. A resistência antimicrobiana é um desafio global e afeta humanos e animais, com impactos importantes. Neste estudo, foram investigadas as respostas de seis isolados de *Pseudomonas aeruginosa* a duas formulações veterinárias antimicrobianas em diferentes condições de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO) sobre a formação de biofilme, motilidade e produção de piocianina. Foram ao todo testadas 16 condições. A hidrofobicidade da parede celular variou entre 91% e 110%. A produção de piocianina foi de 1,46 a 3,26 µg/L. O biofilme do isolado JVD 05 foi inibido em 83,3%, comparado ao controle (0,15/0,12 mg/mL de florfenicol e sulfametoxazol+trimetoprima), no entanto, a adesão aumentou nos isolados JVD05 e JVD07 na presença do florfenicol isoladamente (0,30 mg/mL). A DQO influenciou significativamente nos resultados. Quanto à resistência antimicrobiana, observou-se que, em concentrações mais elevadas de sulfametoxazol+trimetoprima (0,24 mg/mL) para o isolado JVD 05, houve níveis significativos de resistência, especialmente em condições de DQO de 2.000 e 20.000 mg/L. A presença de florfenicol (0,30 mg/mL) e a ausência de sulfametoxazol+trimetoprima mostraram resistência em comparação com a condição de 20.000 mg/L de DQO. No entanto, o baixo nível de DQO, especificamente 400 mg/L, não pareceu contribuir para a resistência. Além disso, na presença de florfenicol (0,30 mg/mL), o isolado JVD 05 experimentou uma significativa redução na motilidade após 24 horas, com reduções de 100% na motilidade *swimming*, 82,8% na motilidade *swarming* e 77% na corrida *twitching*, em comparação com os controles. O florfenicol promoveu a formação de biofilmes classificados como forte adesão em águas com maior carga de matéria orgânica. Concentrações elevadas de florfenicol resultaram em um aumento significativo na adesão de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, Florfenicol, Adesão, Biofilme

DANTAS, Jéssica Vieira. Verification of the phenotypic variation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to antimicrobials for veterinary use. João Pessoa, 2024. Dissertation (Master's in Biotechnology) – Federal University of Paraíba, 2024

ABSTRACT

The *One Health* perspective acknowledges the interconnection between human, animal, and environmental health. Antimicrobial resistance is a global challenge and affects humans and animals with significant impacts. This study investigated the responses of six isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to two formulations of veterinary antimicrobials under different Chemical Oxygen Demand (COD) on biofilm formation, motility and pyocyanin production. There were tests 16 conditions. The hydrophobicity of the cell wall ranged from 91% up to 110%. Pyocyanin production was between 1.46 up to 3.26 µg/L. Biofilm of the isolate JVD 05 reduced 83.3% inhibition of biofilm with the combination of 0.15/0.12 mg/mL of florfenicol and sulfamethoxazole-trimethoprim. Biofilm adherence, however, increased for JVD 05 and JVD 07 when florfenicol was tested alone (0.30 mg/mL). DQO has influenced significantly in the results. Regarding antimicrobial resistance, it was observed that at higher concentrations of sulfamethoxazole-trimethoprim (0.24 mg/mL) for isolate JVD 05, there were significant levels of resistance, especially under DQO conditions of 2,000 and 20,000 mg/L. The presence of florfenicol (0.30 mg/mL) and the absence of sulfamethoxazole-trimethoprim showed resistance compared to the condition of 20,000 mg/L DQO. However, the low DQO level, specifically 400 mg/L, did not seem to contribute to resistance. Additionally, in the presence of florfenicol (0.30 mg/mL), isolate JVD 05 experienced a significant reduction in motility after 24 hours, with reductions of 100% in swimming motility, 82.8% in swarming motility, and 77% in twitching, compared to controls. Florfenicol promoted the formation of biofilms classified as strong adherence in waters with higher organic matter load. Elevated concentrations of florfenicol resulted in a significant increase in *Pseudomonas aeruginosa* adherence.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Florfenicol; Adhesion; Biofilm

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: A representação do ciclo de desenvolvimento do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Figura 2: Elementos que influenciam a resistência aos antimicrobianos (ABR) dentro do contexto da abordagem <i>One Health</i>	26
Figura 3: Estrutura química do florfenicol	31
Figura 4: Estrutura química do sulfametoxazol (A), estrutura química de trimetoprima(B)	31
Figura 5: Ensaios de isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> das amostras de água: (a) amostras em caldo asparagina positivo no teste presuntivo; (b) meio confirmativo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , caldo acetamida positivo; e (c) placas de ágar ceftrimida com inóculo e piocianina difundida no ensaio confirmativo em meio sólido	37
Figura 6: Quantificação da piocianina (em vermelho, fase ácida contendo piocianina protonada)	38
Figura 7: Isolados em meio ágar ceftrimida, confirmatório para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figura 8: Perfil de adesão do biofilme de JVD 05 em meio com DQO de 20.000 mg/L	48
Figura 9: Perfil de adesão do biofilme do isolado JVD 07 em meio com DQO de 20.000 mg/L.....	50
Figura 10: Perfil de adesão do biofilme do isolado JVD 08 em meio com DQO de 20.000 mg/L.....	51
Figura 12: Velocidade de corrida dos isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expostos a 0,3 mg/mL de florfenicol	57
Figura 13: Velocidade de corrida dos isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expostos a 0,24 mg/mL de sulfametoxazol/trimetoprima	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classes de antimicrobianos empregados em animais de maior importância	28
Quadro 2: Demonstrativo acerca das amostras de águas coletadas em um estabelecimento de saúde veterinária, uma instituição de ensino e um açude.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da água residuária sintética utilizada para formação de biofilmes de bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	40
Tabela 2: Condições do ensaio <i>in vitro</i> de inibição do biofilme	41
Tabela 3: Quantificação de piocianina dos isolados	45
Tabela 4: Classificação da hidrofobicidade (MATH) dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de amostras de água	46
Tabela 5: Distribuição do Padrão de Susceptibilidade Antimicrobiana dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
Tabela 6: Avaliação da adesão e inibição de biofilme em meio com DQO de 20.000 mg/L.....	52
Tabela 7: Perfil de adesão de isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expostas aos antimicrobianos em diferentes DQO	53
Tabela 8: Dinâmica do número de células planctônicas de isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expostas aos antimicrobianos em meio com DQO de 20.000 mg/L.....	55
Tabela 9: Dinâmica do número de células planctônicas de isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> expostas aos antimicrobianos em diferentes DQO	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Af – Absorbância final

AHL – N-Acil-homoserina lactona

Ai – Absorbância inicial

ARGs – Genes de Resistência a Antimicrobianos

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FFC – Florfenicol

FFC/SXT – Florfenicol/Sulfametoaxol + trimetropima

LPS – Lipopolissacarídeo

MATH – Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos

MH – Müeller-Hinton

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PYO – Piocianina

RAM – Resistência antimicrobiana

SNC – Sistema Nervoso Central

SXT – Sulfametoaxol + trimetropima

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Objetivo Geral.....	17
2.2.	Objetivos Específicos	17
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.2.	Biofilmes	21
3.3.	Abordagem <i>One Health</i>	24
3.4.	Antimicrobianos e desenvolvimento da resistência microbiana	25
3.5.	Impacto dos medicamentos antimicrobianos usados na medicina veterinária na Resistência Antimicrobiana (RAM).....	26
3.6.	Impacto dos antimicrobianos em ambientes aquáticos	33
4.	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1.	Local do estudo.....	35
4.2.	Medicamentos	35
4.3.	Isolamento e identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
4.4.	Produção de piocianina	37
4.5.	Extração e quantificação de piocianina	37
4.6.	Teste da Hidrofobicidade	38
4.7.	Antibiograma	39
4.8.	Água residuária.....	39
4.9.	Testes <i>in vitro</i> da formação do biofilme	40
4.10.	Testes de Motilidade	42
4.11.	Análise Estatística	43
5.	RESULTADOS	44
5.1.	Isolamento	44
5.2.	Extração e quantificação de Piocianina	44
5.3.	Teste de Hidrofobicidade	45
5.4.	Antibiograma	46
5.5.	Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme	48
5.6.	Ensaio células planctônicas em DQO de 20.000 mg/L.....	53
5.7.	Ensaio células planctônicas em DQO de 400, 2.000 e 20.000 mg/L.....	55
5.8.	Ensaio de Motilidade.....	56

6. DISCUSSÃO	59
6.1. Variação fenotípica dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
6.2. Ensaio de susceptibilidade a antimicrobianos	61
6.3. Avaliação de células planctônicas	62
6.4. Ensaio da formação do biofilme	63
6.5. Avaliação da motilidade	66
7. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

No contexto da saúde pública e da medicina veterinária, a perspectiva *One Health* reconhece a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental. Nessa perspectiva, a resistência antimicrobiana é um desafio global que afeta humanos e animais, com implicações significativas para a saúde e o bem estar de ambos (Wang *et al.*, 2023). A resistência aos antimicrobianos é particularmente preocupante quando se trata de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que essa bactéria demonstra uma capacidade intrínseca de desenvolver resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos (Poole, 2011).

A resistência antimicrobiana é uma ameaça global à saúde pública, e a utilização de antimicrobianos na medicina veterinária desempenha um papel significativo na disseminação e seleção de isolados bacterianos resistentes (Kim; Ahn, 2022; Rousham *et al.*, 2018). Entre os antimicrobianos utilizados na medicina veterinária, florfenicol e sulfametoxazol associada à trimetoprima são exemplos importantes, amplamente empregados no tratamento de infecções bacterianas em animais de produção e de companhia (Chen *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2019).

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa amplamente reconhecida por sua versatilidade e capacidade de adaptar-se a uma variedade de ambientes, tornando-se um patógeno oportunista de importância clínica significativa (Qin *et al.*, 2022; Wood *et al.*, 2023). Ela é comumente encontrada no solo, água e diversos habitats naturais, além de ser um colonizador comum de superfícies hospitalares e equipamentos médicos. Sua prevalência e resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos fazem dela uma ameaça persistente, especialmente para pacientes imunocomprometidos, causando infecções graves, incluindo pneumonias, infecções do trato urinário e infecções de feridas (Liao *et al.*, 2022).

Uma das características fundamentais que contribuem para a virulência e persistência de *P. aeruginosa* é sua capacidade de formar biofilmes. Os biofilmes são comunidades microbianas complexas envolvidas por uma matriz extracelular de polímeros, que conferem proteção contra agentes antimicrobianos, como antimicrobianos, e o sistema imunológico do hospedeiro (Ciofu; Tolker-Nielsen, 2019; Tuon *et al.*, 2022). A formação de biofilme facilita a persistência em ambientes hostis e

contribui para a cronicidade das infecções, tornando-as mais difíceis de tratar e erradicar (Gellatly; Hancock, 2013).

Considerando que linhagens de *P. aeruginosa* manifestariam variações fenotípicas em resposta à exposição a antimicrobianos de uso veterinário, este trabalho teve por objetivo avaliar a formação de biofilmes de isolados de *P. aeruginosa* expostos a formulações antimicrobianas para uso veterinário. Esta abordagem está alinhada com a necessidade urgente de pesquisas que abordem a resistência a formulações de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar aspectos fenotípicos relacionados a formação de biofilmes de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a formulações de dois antimicrobianas para uso veterinário.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar espécimes em amostras de água de ambientes selvagens e hospitalar de *P. aeruginosa*;
- Extrair e quantificar a piocianina produzida pelos isolados;
- Avaliar a hidrofobicidade da parede celular dos isolados;
- Efetuar testes de sensibilidade a antimicrobianos nos isolados;
- Classificar o tipo da adesão celular;
- Testar a interferência dos antimicrobianos sobre a motilidade.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria monoflagelada em forma de bastão, com teste de Gram, negativo e suas dimensões são aproximadamente 0,5–1,0 µm de largura e 1,0–1,5 µm de comprimento (Abdull-Hussein; Atia, 2016). Comumente encontrada em diversos ambientes, como solo, plantas e tecidos de mamíferos (Li; Wu, 2015). Sua persistência no ambiente é notável, multiplicando-se seja na água, seja fixando-se em variadas superfícies (Ambreetha; Singh, 2023). Por conseguinte, a *P. aeruginosa* é amplamente distribuída em cenários naturais e artificiais, ocupando desde lagos até ambientes hospitalares, bem como encanamentos e tubulações (Remold *et al.*, 2011; Tuon *et al.*, 2022).

Além disso, *P. aeruginosa* destaca-se por sua habilidade de adaptação às mudanças no ambiente, manifestando rápida resistência a antimicrobianos e exibindo uma ampla gama de fatores de virulência. Alguns desses fatores são: síntese de fenazinas, cianeto de hidrogênio, sideróforos, ramnolipídios, polissacarídeos, efetores de sistemas de secreção tipo III, toxinas e enzimas líticas (Jurado-martín *et al.*, 2021; Moradali *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2022).

Sendo tão bem adaptada a ambientes diversos e desafiadores, *P. aeruginosa* pode decompor compostos persistentes e é altamente resiliente como microrganismo ambiental, capaz de prosperar em ambientes com escassez de nutrientes e suportar uma ampla variação de temperatura, desde 4 até 42 °C. Sua notável adaptabilidade e habilidade de se manter em oligotrofia permite que suas células sejam viáveis por até 6 meses em superfícies secas e não biológicas dentro de ambientes hospitalares (Diggle; Whiteley, 2020), porém há registros de ao menos ter mantido a viabilidade por 5 anos em águas minerais engarrafadas (Legnani *et al.*, 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destacou *P. aeruginosa* como uma espécie prioritária, para a qual novos antibióticos devem ser desenvolvidos visando prevenir suas infecções (Tacconelli *et al.*, 2018). Até o momento, a terapia antibiótica empírica tem sido empregada para tratar casos de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, o uso excessivo de antibióticos nessa terapia pode resultar no desenvolvimento de genes multirresistentes de *P. aeruginosa*, levando à falha no tratamento antibiótico empírico contra essa bactéria (El Solh; Alhajhusain, 2009; Hirsch; Tam, 2010; Park *et al.*, 2012).

P. aeruginosa também é conhecida por sua capacidade de produzir pigmentos. Esses pigmentos desempenham papéis essenciais e específicos da fisiologia e patogenicidade da bactéria. Há pelo menos seis tipos: fluoresceína (amarelo), pioverdina (verde), piomelanina (marrom), aeruginosina A e B (vermelho-ferrugem) e piocianina (azul). Os três últimos pigmentos mencionados pertencem à classe das fenazinas (Abu *et al.*, 2013; Sá-correia *et al.*, 2012; Ferguson *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017).

A piocianina dissolve-se bem em clorofórmio e em água, sendo produzida idealmente em um pH entre 7,4 e 8,4. Este composto é notável por sua cor azul intensa e, na sua forma oxidada, e mostra dois picos distintos de absorção, entre 230 e 380 nm, e um pico menor próximo de 700 nm, associados às formas protonada e desprotonada do pigmento (Kurachi, 1958; Moayedi *et al.*, 2017; Muller, 2011). A piocianina é um metabólito secundário com atividade redox, cuja estrutura molecular é identificada como 5-metil-1-hidroxifenazina. Este composto é mais produzido na fase estacionária tardia do crescimento bacteriano (Marrez; Mohamad, 2020).

A piocianina é um fator de virulência nas linhagens de *P. aeruginosa*, contribuindo para a patogenicidade da bactéria, com capacidade de extrair ferro do ambiente extracelular. Ela é importante no metabolismo do ferro, participando em processos de redução que ajudam a liberar ferro da transferrina. Este pigmento solúvel em água também pode ser tóxico para diversos órgãos, pois gera espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hassan; Fridovich, 1980; Jayaseelan *et al.*, 2014; Little *et al.*, 2018).

A piocianina contribui para a liberação de DNA extracelular (eDNA) no ambiente, o que aumenta a interação entre células. Isso ocorre devido a mudanças nas características da superfície celular e nas interações físico-químicas, aspectos cruciais para a formação e estabilidade de biofilmes (Das; Manefield, 2012). O complexo formado entre piocianina e eDNA afeta a hidrofobicidade celular, facilitando a criação de condições propícias para o desenvolvimento de biofilmes mais resistentes (Sismaet *et al.*, 2014). O pigmento desempenha um papel crucial na respiração celular, pois um aumento na concentração de piocianina leva a um incremento na absorção de oxigênio pela célula. Adicionalmente, ele atua como um sinalizador fisiológico para a ativação de genes dos sistemas de *quorum sensing* (QS) durante a fase estacionária do crescimento bacteriano (Cox, 1986). Outra vantagem importante da expressão da piocianina e de outras fenazinas ativas

intermediárias da síntese de piocianina é o fato do estresse oxidativo fornecer uma estratégia comum no mundo microbiano (Castañeda-Tamez *et al.*, 2018).

Ademais, a resiliência aos agentes antibióticos não parece estar correlacionada com a produção de piocianina. As discrepâncias no padrão de resistência indicam *que P. aeruginosa* emprega mecanismos multifacetados de maneira concomitante. Contudo, as linhagens que demonstram produção de piocianina tendem a exibir uma maior incidência de resistência a uma variedade de fármacos, bem como uma maior quantidade de características virulentas, quando comparadas às linhagens que não produzem (Gonçalves; Vasconcelos, 2021).

Como um patógeno oportunista multifacetado, *P. aeruginosa* possui a capacidade de desencadear infecções agudas e crônicas, com potencial letal, especialmente em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico, como aqueles com câncer, após procedimentos cirúrgicos, vítimas de queimaduras graves, portadores do vírus da imunodeficiência humana, doenças pulmonares crônicas e implantes cirúrgicos (Abadi *et al.*, 2019; Gale *et al.*, 2015; Gomila *et al.*, 2018; Li; Wu, 2015), destaca-se como um dos principais agentes patogênicos hospitalares, impactando pacientes internados e demonstra intrínseca resistência a uma diversidade significativa de antimicrobianos (Ambreetha; Singh, 2023), pode causar infecções em diversos tecidos humanos, incluindo ceratite, otite, foliculite, osteomielite, pneumonia, endocardite, infecção do trato urinário e infecção de feridas (Doustdar *et al.*, 2019; Rosenthal *et al.*, 2020). No ano de 2017, a *P. aeruginosa* foi identificada como uma das bactérias de maior ameaça à vida, sendo designada como um patógeno prioritário para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos pela Organização Mundial da Saúde (Who, 2017).

Do ponto de vista ecológico, *P. aeruginosa* pode adotar dois modos de vida distintos: vida planctônica e vida sésil. O estado planctônico é encontrado em culturas líquidas, enquanto, na natureza ou em superfícies sintéticas, essa bactéria pode formar aglomerados aderentes, caracterizados por uma secreção de matriz adesiva e protetora, resultando em rearranjos permanentes. Esse agrupamento aderente é denominado por biofilme e neste trabalho será definido como o aglomerado celular que representa uma comunidade bacteriana adaptada que responde a ambientes menos propícios ao crescimento na forma planctônica (Filloux; Vallet, 2003; Vu *et al.*, 2009). Em complemento, *P. aeruginosa* é o modelo de estudo para a formação de biofilmes (Tuon *et al.*, 2022), como descrito na próxima seq

3.2. Biofilmes

A habilidade de colonizar biofilmes é um traço comum às bactérias. Essas estruturas são comunidades multicelulares unidas por uma matriz extracelular. A organização em biofilmes é comum em ambientes naturais, industriais e hospitalares. Os biofilmes podem ser patogênicos e têm a capacidade de liberar toxinas no ambiente circundante. Os biofilmes também se formam em tratos digestivos de humanos e animais, em filtros de tratamento de água e em corpos d'água, muitas vezes de maneira simbiótica, contribuindo para a contaminação da água utilizada em processos industriais e causando bioincrustação, afetando negativamente a qualidade higiênica da água potável (Costerton, 1981; Flemming, 2011; Flemming; Wingender, 2011).

Os biofilmes apresentam uma grande heterogeneidade em sua estrutura, morfologia e fisiologia tridimensional. Segundo Evans *et al.* (2020) e Franklin; Stewart (2008), a morfologia do biofilme varia amplamente, podendo ser lisa, plana, áspera ou filamentosa. Como descrito por Flemming; Wingender (2010), características chave da estrutura madura de um biofilme incluem poros, canais para troca de gases e nutrientes, e regiões densas de células compactadas (Lawrence *et al.*, 1991, Robinson *et al.*, 1984; Stoodley *et al.*, 1994). A morfologia e a composição estrutural dos biofilmes contribuem para a formação de uma variedade de arquiteturas, desde formas planas e indiferenciadas e até macrocolônias semelhantes a cogumelos (Chung *et al.*, 2014; Klausen *et al.*, 2003). A matriz dos biofilmes de *P. aeruginosa* é predominantemente constituída por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídios, sendo variável de acordo com a linhagem bacteriana, assim como as condições de crescimento e a maturidade do biofilme (Pamp; Tolker-Nielsen, 2007). Muitas linhagens têm a capacidade de produzir três tipos de exopolissacarídeos - Pel, Psl e alginato - que desempenham um papel crucial na formação do biofilme, atuando como componentes estruturais da matriz (Hoiby *et al.*, 1974; Matsukawa; Greenberg, 2004; Overhage *et al.*, 2008). Além dos exopolissacarídeos, diversas proteínas como o *pili* tipo IV, fímbria, adesinas, lectinas e fibras amilóides também podem fazer parte da matriz do biofilme de *P. aeruginosa* (Borlee *et al.*, 2010; Diggle *et al.*, 2006; Dueholm *et al.*, 2013; Giltner *et al.*, 2006; Kolter; O'Toole, 1998). Adicionalmente, o DNA extracelular (eDNA) desempenha um papel significativo como componente essencial da matriz nos biofilmes de *P. aeruginosa*, a ruptura das células libera DNA no ambiente, e esse DNA extracelular (eDNA) é um componente vital dos

biofilmes (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Whitchurch *et al.*, 2002). A lise celular pode ser desencadeada por estresses ambientais, como tratamento antimicrobiano, através da atividade endolítica da enzima Lys, que é codificada nos agrupamentos de genes R- e F-piocina. além disso, há evidências que sugerem o envolvimento dos ramnolipídios na formação de microcolônias em *P. aeruginosa* (Turnbull *et al.*, 2016).

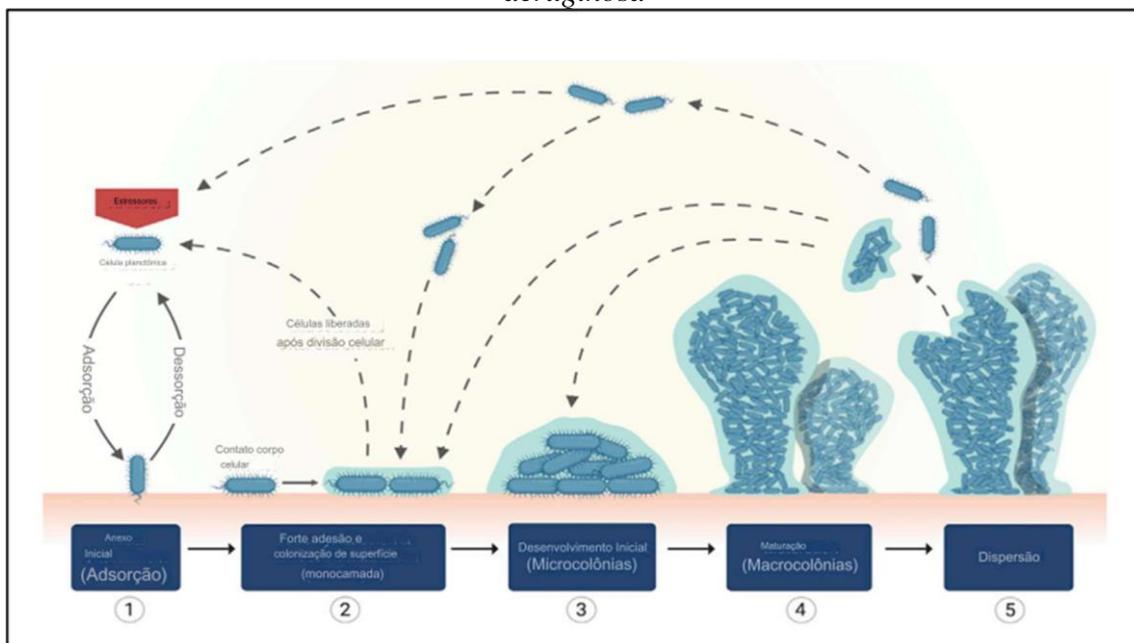
A forma como as bactérias formam biofilmes variam e dependem das condições ambientais e das características específicas de cada linhagem (Dutt *et al.*, 2022). Esse modo de crescimento permite que as células permaneçam próximas aos nutrientes, facilitem a troca de material genético e ofereçam proteção contra diversos estresses químicos e ambientais (Davey; O'toole, 2000).

Biofilmes microbianos são identificados em diversas superfícies, como dispositivos médicos, implantes dentários, materiais de sutura, cateteres, tecidos humanos e animais. Eles também são encontrados em ambientes aquáticos, estruturas úmidas, sejam em condições naturais, sejam artificiais, além de se desenvolverem nas raízes de plantas, podendo desencadear doenças e liberar toxinas na matriz circundante (Donlan, 2002; Percival *et al.*, 2011). Adicionalmente, os biofilmes são encontrados nos tratos gastrointestinais humanos e outros animais, bem como em filtros de águas residuais ou corpos aquáticos (Costerton *et al.*, 1981). Eles são mais comuns em ambientes naturais e são frequentemente responsáveis por desencadear infecções em humanos e animais devido à sua resistência aos antimicrobianos (Mah, 2012; Singh *et al.*, 2000).

A matriz extracelular fornece suporte estrutural e proteção para as bactérias presentes nos biofilmes (Häussler; Parsek, 2009). Além disso, ela desempenha um papel em diversos outros processos, como aderência a superfícies, comunicação entre células e tolerância (Vetrivel *et al.*, 2021). Ela age como um suporte estrutural para a adesão a superfícies, sejam bióticas, sejam abióticas, e serve como refúgio para bactérias durante condições adversas, por exemplo, exposição a antimicrobianos e às respostas imunes do hospedeiro. Adicionalmente, ela fornece uma diversidade de recursos compartilhados, incluindo nutrientes essenciais, enzimas e proteínas citosólicas, beneficiando a comunidade de biofilmes. Essa matriz também desempenha um papel fundamental na comunicação entre as células (Jackson *et al.*, 2004; Ryder *et al.*, 2007; Stempel *et al.*, 2013). Ademais, em biofilmes de *P.aeruginosa* a matriz é composta de três exopolissacarídeos - Psl, Pel e alginato (Billings *et al.*, 2013; Ghaffoor *et al.*, 2011). O

desenvolvimento do biofilme passa por cinco etapas distintas como apresentadas na Figura 1.

Figura 1 – Representação do ciclo de desenvolvimento do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Guzmán-Soto *et al.* (2021) – (1) Fixação inicial (adsorção); (2) Forte adesão e colonização de superfície (monocamada); (3) Desenvolvimento inicial (microcolônias); (4) Maturação (macrocolônias); (5) Dispersão.

Tudo se inicia com as células bacterianas que se fixam a uma superfície usando apêndices celulares como flagelos e *pili* tipo IV (Kolter; O’toole, 1998; Klausen *et al.*, 2003). O movimento limitado dos flagelos é sugerido como mediador da motilidade e da biossíntese de exopolissacarídeos necessários para a adesão à superfície (Hickman *et al.*, 2005). Essa adesão é reversível. Logo após, as células bacterianas transitam de uma ligação reversível para uma irreversível. Na próxima etapa: ocorre a propagação das bactérias aderidas, formando uma estrutura mais organizada chamada de microcolônias. Conseqüente, essas microcolônias se desenvolvem em estruturas tridimensionais extensas, semelhantes a cogumelos, marcando a maturação do biofilme. Na última etapa: no núcleo da microcolônia, há ruptura da matriz pela autólise celular para liberar células dispersas (Ma *et al.*, 2009), seguida pela transição das células sésseis para o modo de crescimento planctônico, semeando espaços não colonizados (Etapa VI), permitindo o ciclo de formação do biofilme se repetir (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

A etapa final no desenvolvimento do biofilme é o desprendimento. Diversos mecanismos de descolamento foram descritos, tais como erosão, descamação e dispersão

(Kim; Lee, 2016). Esse desprendimento do biofilme marca a transição das células do biofilme para o modo de crescimento planctônico (Rumbaugh; Sauer, 2020), levando as células a se fixarem em outras superfícies biomoleculares ou a iniciar um novo ciclo de desenvolvimento do biofilme, porém não é um fenômeno meramente passivo. A estrutura dos biofilmes formados é influenciada pela motilidade, com biofilmes planos resultantes de bactérias altamente móveis, enquanto os biofilmes em forma de cogumelo são gerados por células com baixa motilidade. A taxa de motilidade foi mostrada como sendo específica ao nutriente (Shrout *et al.*, 2006).

3.3. Abordagem *One Health*

"*One Health*" é uma abordagem de Saúde Única global que reconhece a interconexão da saúde humana e animal com o ecossistema em que coexistem (Aslam *et al.*, 2021). A evolução e a preservação da Terra são sustentadas por uma interação simbiótica multiespécies e o ecossistema compartilhado (Amuasi *et al.*, 2020). Conseqüentemente, a antecipação de desafios de saúde globais e possíveis pandemias futuras requer uma atenção específica para compreender as complexidades das interações entre seres humanos, vida animal, ecossistemas e a diversidade de sistemas agrícolas, abordando seus níveis de biossegurança, prevenção de doenças e resposta rápida a surtos (Aarestrup *et al.*, 2021).

Considerando a relevância e a interconexão dos componentes humanos, animais e ambientais na resistência aos antimicrobianos, é justificável abordar essa questão sob a perspectiva da abordagem "Uma só Saúde" (McEwen; Collignon, 2018). A abordagem "*One Health*" tem o potencial de estabelecer conexões e canais de comunicação entre diferentes setores, promovendo a colaboração na pesquisa, no desenvolvimento, na implementação de programas, políticas e legislação.

É relevante observar que os corpos de água doce, que recebem descargas de águas residuais, desempenham o papel de reservatórios de água potável e podem ser utilizados como zonas recreativas (Baquero *et al.*, 2008). A disseminação facilitada de bactérias altamente resistentes do ambiente para seres humanos e animais representa um fator significativo (Mouiche *et al.*, 2019). Os ecossistemas de água doce são considerados locais naturais suscetíveis à contaminação por antimicrobianos provenientes de diversas fontes, como escoamento de fertilizantes, descarga de águas residuais e infiltração de atividades agrícolas próximas. A presença de antimicrobianos no ambiente, combinada

com a elevada concentração de bactérias ativas na água doce, favorece o surgimento e desenvolvimento de genes de resistência aos antimicrobianos (Chen *et al.*, 2017; Marti *et al.*, 2014).

De acordo com Chen *et al.* (2006); Li (2014) diversos agentes antimicrobianos não são completamente metabolizados durante o tratamento terapêutico, resultando na estimativa de que de 30 a 90% são excretados como compostos ativos na água residual. Isso ocasiona a detecção generalizada de diversas classes de antimicrobianos em várias instalações de tratamento de águas residuais urbanas e nos ambientes receptores ao redor do mundo.

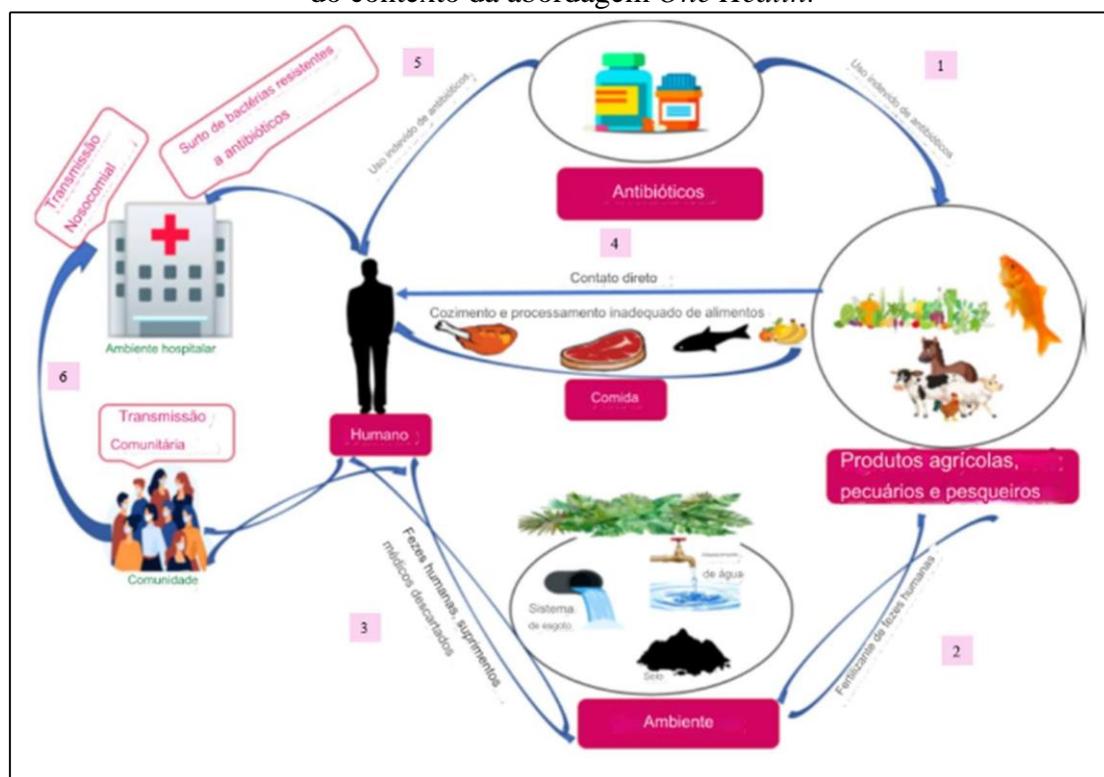
3.4. Antimicrobianos e desenvolvimento da resistência microbiana

Os antimicrobianos representam poluentes orgânicos persistentes que têm despertado preocupação emergente devido aos seus reconhecidos efeitos de longa duração no ecossistema. Conseqüentemente, a resistência antimicrobiana (RAM) deve ser vista como um fenômeno natural ao qual qualquer antibiótico contribui. A ameaça da resistência antimicrobiana (RAM) é principalmente atribuída ao uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, frequentemente sem necessidade ou sem prescrição médica. Adicionalmente, o uso de antimicrobianos em animais (sejam eles de produção alimentar, domésticos ou exóticos) tem contribuído significativamente para a seleção e propagação de bactérias resistentes (Varela *et al.*, 2021; Von wintersdorff *et al.*, 2016). Os agentes antimicrobianos são considerados um elemento essencial na criação e propagação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (ARB) e genes de resistência antimicrobiana (ARGs) (Guo *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a resistência antimicrobiana (RAM) como "uma das dez maiores ameaças à saúde pública global", com projeções indicando que até 2050 poderá ser responsável por mais de 10 milhões de mortes anuais, resultando em uma perda econômica superior a 100 trilhões de dólares em escala mundial (Brogan; Mossialos, 2016). A epidemiologia da resistência antimicrobiana (RAM) é multifacetada e vai além da mera quantidade total de antimicrobianos consumidos, sendo influenciada por diversos fatores. A propagação horizontal de genes de resistência a antimicrobianos (ARGs), inadequações no saneamento, deslocamentos populacionais e o comércio de animais vivos e produtos cárneos são apenas alguns exemplos (Caneschi *et al.*, 2023). Além disso, existe uma relação intrincada entre o uso inadequado de

antimicrobianos e a evolução e propagação da resistência aos antimicrobianos na microbiota humana, vegetal, animal e ambiental (Figura 2) (Ribeiro *et al.*, 2018.). O uso excessivo de antimicrobianos pode acelerar o aparecimento de bactérias e genes resistentes aos antimicrobianos, diminuindo assim a eficácia terapêutica desses medicamentos contra patógenos em humanos e animais (Eze *et al.*, 2018; Higuera-Llantén *et al.*, 2018). Portanto, a progressão da resistência aos antimicrobianos está associada às pressões seletivas resultantes do uso indiscriminado desses medicamentos (He *et al.*, 2018).

Figura 2 – Elementos que influenciam a resistência aos antimicrobianos (ABR) dentro do contexto da abordagem *One Health*.



Fonte: Adaptado de Ahmad *et al.* (2023) – (1) O uso de antimicrobianos na pecuária, agricultura e medicina veterinária promove o desenvolvimento de genes de resistência, em animais (2) são excretados no ambiente, que por sua vez contaminam águas, redes de esgoto e solo (3) ao chegar no ambiente leva ao contato com o ser humano (4) os genes podem ser transmitidos diretamente para os seres humanos por meio de produtos e alimentos contaminados (5) o uso indiscriminado de antimicrobianos na saúde humana contribui para a disseminação da resistência em ambientes hospitalares (6) com potencial subsequente de propagação para a comunidade.

3.5. Impacto dos medicamentos antimicrobianos usados na medicina veterinária na Resistência Antimicrobiana (RAM)

Na área da medicina veterinária, *P. aeruginosa* foi identificada em cães com uma variedade de condições, incluindo otite externa crônica, pioderma, conjuntivite, septicemia, infecções do trato urinário inferior, pneumonia e endocardite bacteriana (Degi et al., 2010). Os medicamentos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária, frequentemente pertencem às mesmas classes dos antimicrobianos utilizados em humanos, como demonstrado no Quadro 1, havendo uma considerável sobreposição, isto é, de antimicrobianos empregados para diversos propósitos (Who, 2017). Por exemplo, bactérias presentes em animais tratados com antimicrobianos podem desenvolver resistência a essas substâncias, e tais bactérias, portadoras de genes de resistência, têm potencial de ser transmitidas dos animais para os seres humanos. Devido à sobreposição no uso de antimicrobianos há uma preocupação crescente de que o uso extensivo desses medicamentos em uma população possa contribuir para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos utilizados na outra (Rahman; Hollis, 2023; Tang *et al.*, 2017).

Os antimicrobianos empregados em medicamentos veterinários ultrapassam cerca de duas vezes o volume utilizado em humanos. Notavelmente, a produção pecuária, englobando suínos, bovinos e aves, representa a maior parte dessa aplicação na pecuária (Kim; Ahn, 2022). Na agricultura, os antimicrobianos desempenham um papel significativo no controle de doenças, agindo como agentes biocidas na produção de culturas e plantas ornamentais. Além disso, em alguns países, existe a liberação para o uso como fatores de crescimento na criação de animais voltados para a produção de carne, leite ou ovos, como porcos, gado, aves e peixes (Silbergeld *et al.*, 2008).

No Brasil, existem regulamentações que proíbem o uso de antimicrobianos com tal finalidade, como a Instrução Normativa MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) nº 17, de 18 junho de 2004; que proíbe a administração, por qualquer meio, na alimentação e produção de aves, de substâncias com efeitos tireostáticos, androgênicos, estrogênicos ou gestagênicos, bem como de substâncias β -agonistas, com a finalidade de estimular o crescimento e a eficiência alimentar; a Instrução Normativa SDA/MAPA nº 35, de 14 novembro de 2005, proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada Carbadox e a Instrução Normativa SDA/MAPA nº 34, de 13 setembro de 2007 – que proíbe o registro e a autorização para a fabricação, a importação, a comercialização e para o uso de produtos destinados à alimentação animal

contendo a substância química denominada Violeta Genciana (Cristal Violeta), com a finalidade de aditivo tecnológico antifúngico, são normativas da legislação brasileira, com o intuito de controlar o uso de antimicrobianos em animais (MAPA, 2021). A mais recente atualização foi realizada por meio da Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020, emitida pelo MAPA, que revisou a relação de aditivos melhoradores de desempenho não autorizados: que proíbe em todo o território nacional a importação, produção, comercialização e uso de aditivos melhoradores de desempenho contendo os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, classificados como essenciais na medicina humana.

Os antimicrobianos podem entrar no ambiente por diversas fontes, tais como resíduos provenientes de atividades humanas, práticas veterinárias e resíduos gerados pela pecuária (Gillings, 2013). Antimicrobianos são administrados a animais produtores de alimentos para diversos propósitos, como uso terapêutico, metafilático, profilático e, também, como promotores de crescimento. Este último envolve a administração de doses baixas (subterapêuticas) de antimicrobianos na ração ou na água ao longo de um período prolongado para aprimorar o crescimento e a eficiência da produção. Apesar de terem sido proibidos como promotores de crescimento na maioria dos países, os antimicrobianos ainda são extensivamente empregados para essa finalidade em regiões específicas (Anh *et al.*, 2021; Canton *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2018; Muaz *et al.*, 2018). O uso excessivo e descontrolado pode levar à presença de níveis baixos e subinibitórios do composto nos tecidos e intestinos dos animais tratados, conforme descrito por Lim *et al.* (2020), assim como no ambiente, conforme observado por Khan *et al.* (2013).

Adicionalmente, a disseminação de Genes de Resistência a Antimicrobianos (ARB) para humanos através de produtos de origem animal tem sido observada por mais de três décadas, especialmente em situações em que os agricultores hospedam ARB semelhantes aos encontrados na microbiota intestinal dos animais de fazenda, como destacado por Bartlett *et al.* (2013).

Quadro 1 – Classes de principais antimicrobianos empregados em animais

CLASSE DE ANTIBIÓTICO		AÇÃO	APLICAÇÕES
Antimicrobianos de importância crítica- prioritários			
Cefalosporina de 3ª e 4ª geração	Cefoperazona; Ceftriaxona; Cefovecina, Cefquinoma (uso veterinário: Ceftiofur)	Inibem a síntese da parede bacteriana e provocam a morte do microrganismo.	A maioria dos bacilos Gram-negativos, principalmente Enterobacteriaceae. <i>Mannheimia</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Haemophilus</i> e <i>Streptococcus</i> .
Macrólídeos	Eritromicina; Espiramicina; (uso veterinário: Tulatromicina; Tilosina; Tilmicosina)	Inibe as bactérias por sua ligação à subunidade 50S ribossomal e pela inibição da síntese proteica bacteriana	Bactérias aeróbias Gram-positivas. contra patógenos respiratórios como <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i> e <i>Histophilus somni</i> . <i>Clostridium</i> e <i>Campylobacter</i> são normalmente sensíveis, <i>Lawsonia intracellularis</i> é sensível.
Polimixinas	Colistina	Interagem com o fosfolípido da membrana celular. São capazes de penetrar a membrana celular de bactérias e romper sua estrutura.	A maioria dos bacilos aeróbios Gram-negativos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i>
Quinolonas	Ciprofloxacina; Norfloxacina; (uso veterinário: Enrofloxacina; Danofloxacina; Marbofloxacina)	Age pela inibição da DNA girase na bactéria inibindo a síntese de DNA e RNA.	<i>Staphylococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> e <i>Pasteurella</i> . A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> é moderadamente sensível ao antimicrobiano,
Antimicrobianos de importância crítica- Elevada prioridade			
Aminoglicosídeos	Gentamicina; Estreptomicina; Apramicina; Neomicina	Inibe a síntese da proteína bacteriana por meio da sua ligação ao ribossomo 30S	<i>Staphylococcus</i> e bacilos Gram-negativos das Enterobacteriaceae.
Ansamícinas	Rifampicina; Rifaximina	Inibe a síntese de RNA bacteriano	Gram-positivas (<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Mycobacterium spp.</i> , <i>Haemophilus spp.</i> , <i>Neisseria spp.</i> e <i>Chlamydia spp.</i>
Penicilinas	Penicilina; Ampicilina, Amoxicilina; Amoxicilina x Ácido clavulânico; Ticarcilina	Inibe a síntese da parede celular bacteriana.	<i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> não produtores de beta-lactamase, além de outros cocos e bacilos Gram-positivos, algumas espécies de <i>Proteus</i> , <i>Pasteurella multocida</i> e <i>Histophilus</i> .
Antimicrobianos de elevada importância			

Anfenicóis	Uso veterinário: Florfenicol	Está envolvido na inibição da síntese proteica, por meio da ligação a ribossomos.	todos os organismos sensíveis ao cloranfenicol, bacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos e micoplasma.
Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	Cefalexina; Cefalotina; Cefazolina	Inibem a síntese da parede bacteriana e provocam a morte do microrganismo	espécies de <i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> e alguns bacilos Gram-negativos, como <i>Pasteurella</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,
Lincosamidas	Clindamicina; (uso veterinário: Pirlimicina)	Inibe a síntese proteica bacteriana por inibição ribossomal	principalmente contra bactérias Gram-positivas, como <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e bacilos Gram-positivos, como <i>Corynebacterium</i> .
Sulfonamidas	Sulfadiazina; Sulfametazina; Sulfatiazole	Competem com o ácido para-aminobenzoico (PABA) pela enzima que sintetiza o ácido diidrofólico bacteriano	Bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e alguns protozoários
Sulfonamidas e Diaminopiridinas	Sulfametoxazol + trimetropim	Os sulfonamidas são inibidores competitivos da síntese do dihidrofolato. A trimetopriminibe a enzima di-hidrofolato redutase.	Gram-negativas e Gram-positivas
Tetraciclínas	Tetraciclina; Oxitetraciclina; Doxiciclina	ligar-se à subunidade ribossomal 30S e inibir a síntese da proteína bacteriana	Possui um amplo espectro de ação, incluindo bactérias, alguns protozoários, <i>Rickettsia</i> e <i>Ehrlichia</i> .

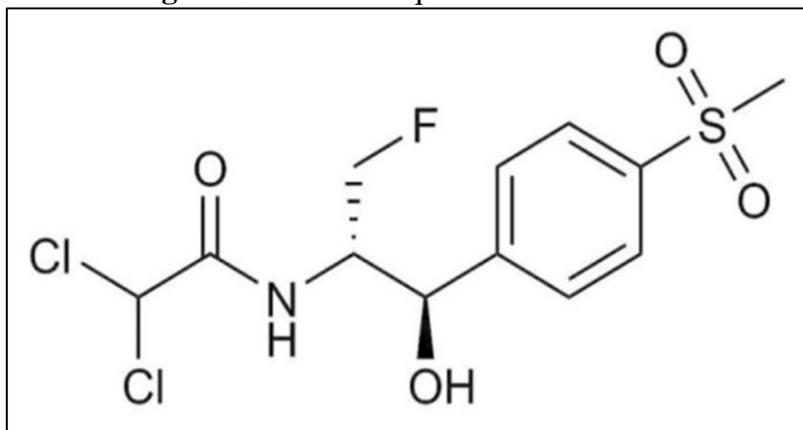
Fonte: adaptado de OIE (2015); Papich (2012); Who (2019).

O florfenicol, é um antibiótico de amplo espectro, visto que sua presença no ambiente, resulta em um impacto inevitável sobre os microrganismos, conforme documentado por Kim *et al.*, (2022), este antibiótico é particularmente prevalente no setor de aquicultura, sendo um dos mais utilizados globalmente (Norambuena *et al.*, 2013). O florfenicol é um antimicrobiano análogo fluorado do cloranfenicol e tianfenicol (Park *et al.*, 2012). O mecanismo de ação do florfenicol baseia-se na inibição da síntese proteica por meio da ligação à fração 50S do ribossomo bacteriano (Orlando *et al.*, 2016).

Este antibiótico demonstra alta atividade contra patógenos respiratórios primários, incluindo *Mycoplasma spp.*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*, frequentemente associados a doenças respiratórias em animais de criação (Yang *et al.*, 2023). O florfenicol também é utilizado no tratamento de infecções em peixes, devido ao seu espectro, abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo, mas não

se limitando, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophyla*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* e *Vibrio anguillarum* (Carraschi *et al.*, 2011).

Figura 3 – Estrutura química do florfenicol



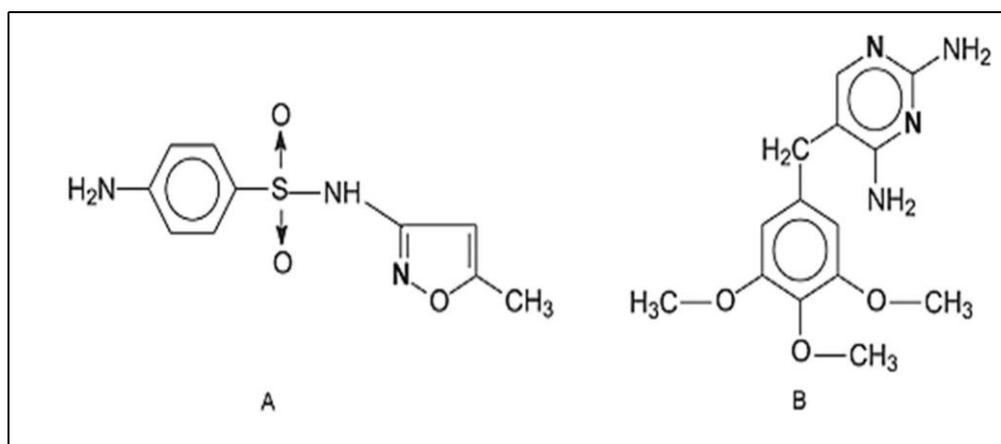
Fonte: Yang *et al.*, (2023)

Na China, o uso de florfenicol na aquicultura é particularmente extensivo, atingindo um volume anual de cerca de 10.000 toneladas (Qiao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2015). Assim, considera-se o florfenicol um dos antimicrobianos mais usados exclusivamente em animais (Li *et al.*, 2013). Devido a seu alto consumo, descarga no meio ambiente e persistência, o florfenicol foi frequentemente detectado em diversos ambientes aquáticos (Dong *et al.*, 2016; He *et al.*, 2018).

A sulfametoxazol (4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida) é um representante chave das sulfonamidas, e atualmente é o medicamento mais empregado dessa categoria, tornando-se uma das substâncias mais frequentemente encontradas no ambiente (Hanna *et al.*, 2018; Loos *et al.*, 2018).

As sulfonamidas são excretadas parcialmente em sua forma original, principalmente através da urina (Prescott, 2013). A presença destes compostos em diversas matrizes aquáticas ambientais foi amplamente documentada em várias regiões ao longo das últimas décadas na entrada e saída de estações de tratamento de esgotos (ETE), em países como Alemanha, Portugal e Quênia (Santos *et al.*, 2013).

Figura 4 – Estrutura química do sulfametoxazol (A), estrutura química de trimetoprima(B).



Fonte: Cordeiro; Peralta-zamora, (2008)

A trimetoprima, uma diaminopirimidina paradigmática, é frequentemente utilizado em conjunto com sulfonamidas para intensificar o efeito bactericida através de um mecanismo sinérgico. Esta combinação, particularmente, trimetoprima com sulfametoxazol, é amplamente utilizada. A presença de trimetoprima foi identificada em estações de tratamento de águas residuais e efluentes hospitalares em diversos países, incluindo o Reino Unido, Croácia, Grécia, Itália e Suécia (Kasprzyk-Hordern et al., 2009; Kosma *et al.*, 2014; Santos et al., 2013; Verlicchi *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação resulta do efeito sinérgico da inibição do metabolismo do ácido fólico em bactérias, atribuída à ação combinada das sulfonamidas, que atuam como inibidores competitivos na síntese do di-hidrofolato, e da trimetoprima, que inibe a enzima di-hidrofolato redutase. A combinação sulfametoxazol+trimetoprima é utilizada no tratamento de diversas infecções em cães, abrangendo o trato urinário inferior, gastrointestinal, infecções cutâneas e de tecidos moles, infecções prostáticas, pneumonia e infecções do sistema nervoso central (SNC). Em equinos, é empregada para tratar infecções respiratórias, articulares, abdominais, bem como infecções em tecidos moles e no SNC. A combinação também é ocasionalmente empregada no tratamento de infecções causadas por protozoários, como infecções por coccídios e toxoplasma (Papich, 2012).

Segundo Boxxal *et al.* (2003), florfenicol, sulfametoxazol/trimetoprima, dentre outros antimicrobianos, representam algumas das substâncias antibióticas com elevado risco de propagação ambiental. Este fenômeno é impulsionado principalmente pelo uso intensivo desses antimicrobianos na pecuária e na aquicultura. A forma como esses medicamentos são administrados, geralmente por vias tópica ou oral, e a sua baixa taxa

de metabolização no organismo dos animais contribuem para sua disseminação no ambiente.

3.6. Impacto dos antimicrobianos em ambientes aquáticos

A existência e os impactos dos compostos farmacologicamente ativos no meio aquático têm emergido como uma preocupação crescente no campo da química ambiental (Heberer, 2002). Awad *et al.* (2014) observaram concentrações elevadas de tetraciclina e sulfonamidas na água do rio adjacente a uma instalação de compostagem de resíduos suínos na Coreia do Sul. Da mesma forma, Cheng *et al.* (2019) relataram a presença de quinolonas, tetraciclina, anfenicóis e sulfonamidas em amostras de água coletadas em rios do norte da China, com concentrações variando de 0,2 a 421 ng/L.

Adicionalmente, a prática da aquicultura em si representa uma fonte considerável de contaminação ambiental por antimicrobianos. O uso extensivo de uma variedade de antimicrobianos tem sido associado ao desenvolvimento de resistência bacteriana a esses agentes nos ecossistemas aquáticos, bem como a modificações nas comunidades bacterianas. Em 2005, os antimicrobianos mais comumente utilizados na aquicultura eram a flumequina (cerca de 40%), oxitetraciclina (aproximadamente 25%), ácido oxolônico (cerca de 20%) e florfenicol (em torno de 15%). Já em 2016, o florfenicol emergiu como o mais prevalente, sendo utilizado em mais de 80% dos casos, seguido pela oxitetraciclina, empregada em menos de 20% das situações (Bojarski *et al.*, 2020). Já Holmstrom *et al.* (2003) relataram que na carcinicultura tailandesa, os agentes antibacterianos, tais como tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas, e outros, são frequentemente utilizados seja no tratamento de doenças, seja como medida profilática.

A preocupação com a presença de resíduos de antimicrobianos nos tecidos comestíveis dos peixes tratados, os riscos ambientais associados e o desenvolvimento de bactérias resistentes são considerados temas de grande relevância (Monteiro *et al.*, 2018). Os estudos anteriores, a maioria dos dados obtidos, os quais são provenientes da China, revelaram a presença de 11 grupos de agentes antibacterianos nos ecossistemas aquáticos. Sulfonamidas foram os mais frequentemente detectados, representando 33% dos registros, seguidos pelas fluoroquinolonas (23%), tetraciclina (18%), macrólidos (12%), diaminopirimidinas (7%) e antibióticos fenicol (2,6%). Relatos sobre a presença de aminoglicosídeos, β -lactâmicos, lincosamidas e pleuromutilinas são menos frequentes

(Cui *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2016; Fisch *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2018)

Um aumento considerável na frequência de bactérias resistentes à oxitetraciclina, quinolonas, sulfametoxazol/trimetoprima, florfenicol e amoxicilina foi observada em fazendas de aquicultura onde esses antibióticos foram empregados (Cabello *et al.*, 2013). Os antimicrobianos persistem no meio aquático em concentrações significativas ao longo do tempo, exercendo uma pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana nas bactérias. A prática da aquicultura pode ampliar a incidência de resistência aos antibióticos em patógenos bacterianos humanos e animais, uma vez que as instalações de aquicultura frequentemente recebem esterco animal e urina contendo antibióticos, além de bactérias portadoras de genes de resistência (Di Cesare *et al.*, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA), localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB campus I – João Pessoa.

4.2. Medicamentos

Os produtos médicos veterinários empregados foram comprados em uma farmácia veterinária e de produtos agrícolas, e consistiram no antibiótico de amplo espectro Florfenicol 30% (VETFLOR[®], JA Saúde Animal, Patrocínio Paulista-SP) em formato injetável, disponível em frasco de 30 mL, composto por 30 g de florfenicol e 100 mL de veículo *quantum sufficit*. O segundo medicamento utilizado foi o Trimetoprima/Sulfametoxazol (TRISSULFIN[®], Ourofino, Cravinhos-SP) injetável, apresentado em frasco de 50 mL, contendo 10 g de sulfametoxazol, 2 g de trimetoprima e um veículo *quantum sufficit* 50 mL. O critério de seleção para ambos seguiu a classificação de antimicrobianos de amplo espectro, considerando aqueles mais utilizados e frequentemente encontrados em amostras aquáticas.

4.3. Isolamento e identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a obtenção dos espécimes, utilizou-se o método 9213F da APHA; AWWA; WEF (2012) para isolamento em amostras de água e efluentes. O método 9213E é baseado na utilização de um meio seletivo, para promover o crescimento de *P. aeruginosa* e inibir o crescimento de outros microrganismos presentes na amostra.

Em condições assépticas foram coletados 500 mL de água em diferentes pontos no perímetro irrigado de São Gonçalo distrito do município de Sousa-PB (Quadro 2). As amostras foram obtidas dos seguintes locais: duas amostras do açude São Gonçalo (6,85187° S, 38,32468° W); duas do Hospital Veterinário Adílio Santos de Azevedo, coletadas da torneira do ambulatório 1 na clínica médica de pequenos animais e da lavanderia (6,84243° S, 38,29885° W); e de torneiras do laboratório de alimentos e do banheiro feminino no bloco do curso de Agroindústria do Instituto Federal da Paraíba (6,84219° S, 38,29891° W).

Quadro 2 – Demonstrativo acerca das amostras de águas coletadas em um estabelecimento de saúde veterinária, uma instituição de ensino e um açude.

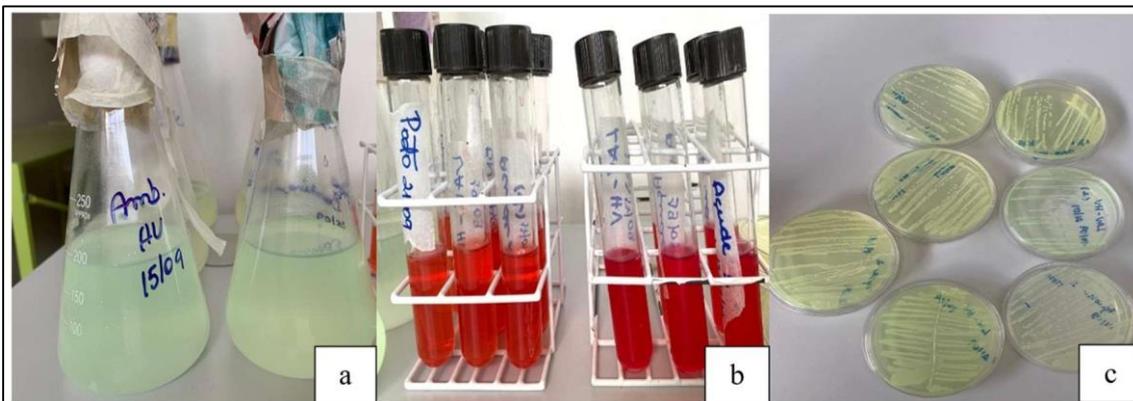
Data da coleta	Nomenclatura	Local	Coordenadas	Cadastro SisGen
14/09/2022	JVD03	Laboratório de Alimentos	6,84219° S, 38,29891° W	AAA6559
	JVD 04	Banheiro Feminino		A78C5F3
	JVD 05	Ambulatório – HV	6,84243° S, 38,29885° W	A8A9D5A
	JVD 06	Lavanderia – HV		A048BA8
	JVD 07	Açude 1	6,85187° S, 38,32468° W	AD6CFAA
	JVD 08	Açude 2		AC65073

Fonte: elaboração própria

A etapa do isolamento foi realizada em dois estágios, denominados por ensaio presuntivo e ensaio confirmativo (Figura 5). No ensaio presuntivo, alíquotas de 10 mL das amostras coletadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo asparagina visando obter crescimento de *Pseudomonas* spp., presumido pela observação da formação de turbidez e fluorescência sobre lâmpada UV à 360±20 nm (CRS, modelo DL-01), após incubação à 29±1 °C por 24-48h.

O ensaio confirmativo foi realizado com a inoculação de alíquotas de 1mL dos tubos positivos do caldo asparagina para novos tubos contendo 10 mL de caldo acetamida. Após incubação por 24-48h a 30 °C, observou-se a mudança da coloração vermelha para fúcsia. Dos tubos positivos, foram tomadas alçadas para semeadura em ágar cetrimida (meio específico) dispensado em placas de Petri. Esse teste visou confirmar *P. aeruginosa* em base sólida pela produção e difusão de piocianina, elemento chave para identificação dos isolados para este trabalho. A incubação ocorreu à 29±1 °C por 24-48h (APHA; AWWA; WEF, 2012).

Figura 5 – Ensaio de isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* das amostras de água: (a) amostras em caldo asparagina positivo no teste presuntivo; (b) meio confirmativo de *Pseudomonas aeruginosa*, caldo acetamida positivo; e (c) placas de ágar cetrimida com inóculo e (c) placas de ágar cetrimida com inóculo e piocianina difundida no ensaio confirmativo em meio sólido.



Fonte: Arquivo pessoal

4.4. Produção de piocianina

Todos os isolados foram inoculados por esgotamento em 20 mL de ágar cetrimida (MERCK) composição (Peptona 20 g/L; $MgCl_2$ 1,4 g/L; K_2SO_4 10 g/L; Cetrimida 0,3 g/L, Agar-Agar 13,6 g/L, Glicerol 10 mL/L), dispensado em placas de Petri com 90 mm de diâmetro e incubados por 48 horas a uma temperatura de 29 ± 1 °C. Após o crescimento e a observação do pigmento espalhado na placa, caracterizado por coloração azul ou verde, procedeu-se à extração e quantificação.

4.5. Extração e quantificação de piocianina

A extração da piocianina foi conduzida segundo adaptação do método da base sólido (Devnath et al., 2017). Após o crescimento das células, a superfície do ágar cetrimida foi lavada com água destilada esterilizada e todo o ágar foi cortado em pequenos cubos, posteriormente transferidos para tubos de centrifugação com capacidade de 50 mL, aos quais foram adicionados 20 mL de clorofórmio 99% (Quemis, Joinville, Brasil). Após agitação em vórtex por 10 minutos, a fase orgânica (com coloração azul) foi separada e em seguida, acidificada com HCl 0,2 mol/L sendo novamente agitada.

Após um breve repouso, a fase acidificada, contendo a piocianina protonada (com coloração vermelha), (Figura 6) foi neutralizada com gotas de solução-tampão Tris-Base concentrada (1,5 mol/L), retornando à coloração azul. A absorbância desta solução foi medida a 520 nm (Kasvi, K37-VIS) e concentração de piocianina foi determinada a partir da equação determinada por curva padrão realizada com piocianina 98% (Sigma Aldrich,

St. Louis, USA). Uma vez conhecida a concentração de piocianina em $\mu\text{g/mL}$, foi realizada a conversão considerando o volume do cilindro formado com o ágar na placa (20 mL). Todo o ensaio foi realizado em triplicata, sob as mesmas condições para os espécimes. A equação construída com base na curva padrão: $\text{PYO} = [\text{OD}_{580} - 6 \times 10^{-4}] \div 14,026$ ($r = 0,9999$), preparada com PYO 98% (Merck KGaA, Alemanha).

Figura 6 – Quantificação da piocianina
(em vermelho, fase ácida contendo piocianina protonada)



Fonte: arquivo pessoal

4.6. Teste da Hidrofobicidade

A hidrofobicidade da membrana celular se refere à característica da membrana que apresenta uma estrutura predominantemente impermeável à água e a outras moléculas polares. O teste baseia-se na observação de que as células aderem ao hidrocarboneto, o que resulta na redução da densidade óptica na fase aquosa. Isso reflete a capacidade de aderência das células à uma superfície. Utilizou-se a técnica Adesão Microbiana Modificada a Hidrocarbonetos (MATH) com modificações descrita por Tyfa et al. (2015). O ensaio MATH é uma técnica utilizada para avaliar a hidrofobicidade das células bacterianas. As células são suspensas em soluções tamponadas e misturadas com xileno. Após incubação e homogeneização, as fases orgânica e aquosa são separadas e a densidade óptica da fase aquosa é medida. A porcentagem de adesão celular aos hidrocarbonetos é então calculada, permitindo categorizar o grau de hidrofobicidade dos espécimes bacterianas (Tyfa et al., 2015).

Inicialmente suspensões dos espécimes de *P. aeruginosa* de crescimento recente foram preparadas em tampão PBS (pH 7,2), com a absorbância variando entre 0,4-0,6 a

600 nm (Ai). Em seguida, 0,5 mL de xileno foi adicionado a 2,5 mL da suspensão, a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto, após repouso de 10 minutos à 25 °C, os tubos foram novamente agitados por 1 minuto em vórtex e deixados em repouso por 50 minutos. Foram medidas as absorbâncias da fase aquosa a 600nm nos intervalos 10 e 60 minutos (Af) em espectrofotômetro (Kasvi, K37-VIS). A porcentagem da hidrofobicidade foi determinada usando a fórmula: $[(1-Ai) \div Af] \times 100$. A hidrofobicidade foi classificada como forte (> 50%), moderada (20-50%) ou fraca (<20%).

4.7. Antibiograma

Devido à origem desses organismos em ambientes considerados hostis e à recente separação desses espécimes, foi essencial realizar uma triagem para determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos específicos da terapia empírica antipseudomonas. O teste foi conduzido com o objetivo de escolher os isolados para o ensaio do biofilme e foi realizado pelo método Kirby-Bauer (NCCLS, 2003).

Inicialmente realizou-se a preparação dos inóculos pelo método de suspensão direta das colônias em solução salina NaCl 0,9% de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de MacFarland. Utilizando um *swab* esterilizado, a suspensão foi inoculada em ágar Müeller-Hinton (MH), espalhando o inóculo uniformemente. Após secagem da placa, os discos de antimicrobianos (CECON, São Paulo, Brasil) foram gentilmente aplicados na superfície. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Tobramicina (10 µg), Imipenem (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Levofloxacina (5 µg), Polimixina B (300 UI), Norfloxacina (10 µg), Meropenem (10 µg), Aztreonam (30 µg), Ofloxacina (5 µg), Amicacina (30 µg), Piperacilina e Tazobactam (100/10 µg), Gentamicina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Cefepime (30 µg), Ceftazidima (30 µg). As placas foram incubadas a 30° C por 18 h e após incubação foi realizada a medição dos halos em mm, com uma régua e os valores interpretados nas tabelas de leitura de antibiograma contra *P. aeruginosa*, com base no CLSI.

4.8. Água residuária

O meio projetado para o cultivo de biofilmes foi cuidadosamente elaborado para simular diferentes níveis de contaminação da água de maneira sintética. A Tabela 1 contém informações sobre a composição da solução mãe utilizada como base. Essa solução mãe (20.000 mg/L) foi preparada com precisão e, em seguida, submetida a

diluição para produzir concentrações específicas de 400 e 2.000 mg/L. Esse processo de diluição foi executado de acordo com procedimentos padronizados para garantir a consistência e a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

Tabela 1 Composição da água residuária sintética utilizada para formação de biofilmes de *Pseudomonas* sp.

Composto	Quantidades em mg/L
	DQO
	20.000 ppm
Sacarose	17
Extrato de levedura	3,92
Ureia	1,24
Cloreto de cálcio	0,055
Sulfato de magnésio	0,045
Fosfato ácido de potássio	0,065
Fosfato diácido de potássio	0,055
Cloreto de ferro III	0,005

Fonte: Reyes-Lara e Reyes-Mazzoco (2009)

4.9. Testes *in vitro* da formação do biofilme

Foi realizado o ensaio empregando a técnica da microdiluição em placas de poliestireno com 96 poços e fundo em U. Os poços foram preenchidos com água residuária, variando-se a Demanda Química de Oxigênio, bem como da concentração dos antimicrobianos (Tabela 2).

As concentrações dos antimicrobianos foram testadas isoladamente e em associação. Para o florfenicol foram preparadas soluções diluídas em DMSO dimetilsulfóxido, (1%) de 0,30, 0,15 e 0,08 mg/mL, a partir da solução padrão, isto é, a forma como é adquirida no mercado e nas concentrações 1/2 e 1/4. Do mesmo modo, foram preparadas em DMSO (1%) as soluções de sulfametoxazol+trimetoprima, de 0,24, 0,12 e 0,06 mg/mL, considerando para esta formulação, a concentração do princípio ativo, sulfametoxazol. O propósito final desse experimento foi determinar os isolados mais resistentes às concentrações diluídas desses medicamentos.

Suspensões dos isolados foram preparadas em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, com turbidez ajustada para 0,5 na escala de MacFarland. Em placas de microdiluição de fundo “U” foram inseridos 100 uL de água sintética residuária (DQO = 400, 2.000 e 20.000 mg/L), 100 uL das soluções dos medicamentos, incluindo o controle e 10 uL da suspensão do inóculo. As placas foram incubadas por 4h, a 30°C e todo teste foi realizado em triplicata. Após o período de incubação as placas foram visualizadas em leitor de placas (BIOTEK EL800) ao comprimento de onda de 630 nm, para a quantificação das células planctônicas.

Tabela 2 – Condições do ensaio in vitro de inibição do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*

Condições	FFC (mg/mL)	SXT (mg/mL)	Condições	FFC (mg/mL)	SXT (mg/mL)
1	0,00	0,00	9	0,30	0,12
2	0,00	0,24	10	0,30	0,06
3	0,00	0,12	11	0,15	0,24
4	0,00	0,06	12	0,15	0,12
5	0,30	0,00	13	0,15	0,06
6	0,15	0,00	14	0,08	0,24
7	0,08	0,00	15	0,08	0,12
8	0,30	0,24	16	0,08	0,06

Fonte: elaboração própria

FFC – florfenicol; SXT – sulfametoxazol + trimetoprima

Para quantificar o biofilme formado foi utilizada a técnica do cristal violeta (Batista et al., 2017), adaptado. Após incubação por 4 horas a 30 °C, os poços foram lavados com água destilada esterilizada para remover as células em suspensão. Em seguida, 210 µL da solução de cristal violeta 1% (PROC9, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil) foram adicionados e permaneceram durante 20 minutos nos poços. Posteriormente, o corante foi removido e o excesso lavado com água destilada. Após a secagem, os poços foram preenchidos com 210 µL de etanol 99,6% (Química Moderna, Baueri-SP), e após um período de repouso de 15 minutos, a absorbância da solução cristal violeta-etanol foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placas (BIOTEK EL800). Os resultados foram apresentados como o valor da densidade óptica em gráfico de

combinação e como a porcentagem de formação de biofilme, em comparação ao controle, ou seja, crescimento apenas no meio de cultura.

A adesão celular foi classificada de acordo com Charlton *et al.* (2008), em que se consideram as células fraca (< 40%), moderada (40-80%) ou altamente aderidas (> 80%). Por outro lado, o efeito antibiofilme foi considerado se a inibição, comparada ao controle foi superior a 80%. Esta classificação é fundamental para a avaliação e interpretação do comportamento de biofilmes em diversos contextos microbiológicos, fornecendo uma base clara para a compreensão da intensidade com que diferentes linhagens bacterianas aderem a superfícies sob variadas condições experimentais ou ambientais. A aplicação desses critérios permite uma análise mais precisa e padronizada da capacidade de formação de biofilme por diferentes organismos, um aspecto crucial tanto na pesquisa básica como em aplicações práticas no controle de infecções e no desenvolvimento de estratégias antibiofilme.

Foi realizado um teste piloto com DQO de 20.000 mg/L. As células planctônicas em todos os testes foram quantificadas pelo sobrenadante removido e determinação da absorvância a 620 nm.

4.10. Testes de Motilidade

Preparou-se uma suspensão recente de *P. aeruginosa* JVD 05 e JVD 07, ajustando a turbidez ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Os meios de cultura foram preparados de maneira independente, com a adição de um único antibiótico, cada. O florfenicol foi incorporado a uma concentração de 0,30 mg/mL em um dos meios, enquanto o sulfametoxazol foi adicionado em uma concentração de 0,24 mg/mL no outro meio de cultura. É importante ressaltar que os antibióticos foram introduzidos nos meios de cultura individualmente, e não em combinação ou simultaneamente. A suspensão dos espécimes foi inoculada em ágar BHI semissólido para avaliar a motilidade do tipo *swimming*, na superfície do ágar BHI para testar a motilidade do tipo *swarming*, e no fundo de uma placa de Petri coberta por ágar BHI para verificar a motilidade do tipo *twitching*, conforme descrito por Rossi *et al.* (2018). As placas foram incubadas por 48 horas a 30 ± 1 °C. Após a incubação, mediu-se o diâmetro da zona de corrida (em milímetros) a partir do ponto de inoculação. Como controle, foi utilizado meios sem antimicrobianos e os halos foram medidos após 24 e 48 horas de incubação. A velocidade

foi calculada com a distância da corrida (S, em micrômetros), pelo tempo (t, em segundos), empregando a fórmula: $V^{\mu\text{m}/\text{s}} = S (\text{mm}) * 1000 / t (84.6000)$

4.11. Análise Estatística

Os testes foram conduzidos em triplicata. Os valores foram expressos na forma de média do percentual \pm desvio padrão. Os dados foram tratados utilizando o *software* R, versão 4.2.1, *open access*, em que foram aplicados o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. O resultado do teste indicou uma distribuição não normal. Devido à não conformidade dos dados com uma distribuição normal, optou-se pela aplicação do Teste de Kruskal- Wallis.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento

Baseado na produção de piocianina no agar cetrimida, foram obtidos seis isolados de *P. aeruginosa*, de amostras exclusivamente de água, os quais foram identificados por meio das siglas JVD03, JVD04, JVD05, JVD06, JVD07 e JVD08 (Figura 7). Todos esses isolados estão devidamente registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associados (SisGen) sob os números AAA6559, A78C5F3, A8A9D5A, A048BA8, AD6CFAA e AC65073, respectivamente.

Figura 7 – Isolados em meio ágar cetrimida, confirmatório para *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: arquivo pessoal

5.2. Extração e quantificação de Piocianina

Baseado no fato da identificação dos isolados de *P. aeruginosa* foi pela expressão de piocianina, houve a necessidade de investigar a quantificação do pigmento. A concentração de piocianina produzida variou de 0,56 $\mu\text{g/L}$ (JVD 08) a 3,26 $\mu\text{g/L}$ (JVD 05), (Tabela 3). De forma mais específica, destacaram-se os isolados JVD 05, JVD 04 e JVD 03, que demonstraram uma produção notavelmente superior de piocianina, quando comparada aos demais isolados. As concentrações medidas para estes isolados foram, respectivamente, 3,26; 2,69; e 1,46 $\mu\text{g/L}$, indicando uma variação significativa na eficiência de produção desse pigmento entre os diferentes isolados. Este achado sugere

uma diversidade na expressão genética e na atividade metabólica associadas à produção de piocianina entre os isolados de *P. aeruginosa* estudados.

Foi observado um contraste notável na quantidade de pigmento produzido entre os diferentes isolados. Os espécimes JVD 06, JVD 07 e JVD 08 apresentaram valores mais baixos de piocianina, registrando 0,69; 1,41; e 0,56 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Este padrão de produção varia significativamente entre os isolados, indicando uma diversidade fenotípica quanto a produção de piocianina entre diferentes espécimes de *P. aeruginosa*.

Tabela 3 – Quantificação de piocianina dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

Isolado	Concentração de PYO ($\mu\text{g/L}$)
JVD 03	1,46
JVD 04	2,69
JVD 05	3,26
JVD 06	0,69
JVD 07	1,41
JVD 08	0,56

Fonte: elaboração própria

5.3. Teste de Hidrofobicidade

Observou-se uma variação no nível de hidrofobicidade entre os diferentes isolados bacterianos testados no ensaio MATH entre 90 e 110%. Os resultados indicaram que todos os isolados bacterianos testados apresentaram valores superiores a 90% (Tabela 4), classificando-os como fortemente hidrofóbicos, isto é, apresentam um elevado grau de repelência à água em suas superfícies celulares.

Entre os isolados, JVD 03, JVD 05 e JVD 07 se sobressaíram com as maiores porcentagens. Especificamente, a linhagem JVD 03 apresentou um valor de 110%, enquanto as linhagens JVD 05 e JVD 07 registraram valores de 106% e 107%, respectivamente.

Tabela 4 – Classificação da hidrofobicidade (MATH) dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de amostras de água

Isolado	Hidrofobicidade (%)	Classificação
JVD 03	110	Fortemente Hidrofóbica
JVD 04	94	Fortemente Hidrofóbica
JVD 05	106	Fortemente Hidrofóbica
JVD 06	90	Fortemente Hidrofóbica
JVD 07	107	Fortemente Hidrofóbica
JVD 08	97	Fortemente Hidrofóbica

< 20% - Hidrofílica; 20-50 moderadamente hidrofóbica; > 50% fortemente hidrofóbica

Fonte: elaboração própria

5.4. Antibiograma

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos antipseudomonas mostrou uma elevada frequência de sensibilidade, entretanto observou-se resistência em 5 dos 6 isolados testados para os seguintes antimicrobianos: meropenem, aztreonam, ácido nalidíxico e cefepime e cefazidima (Tabela 5). Com exceção de JVD 03, dois isolados foram resistentes a um antibiótico e quatro isolados a pelo menos três antimicrobianos de classes diferentes.

JVD 03 demonstrou uma notável sensibilidade a doze dos treze antimicrobianos testados. Contudo, para o ácido nalidíxico, este isolado foi classificado na categoria intermediária, indicando uma eficácia moderada do antimicrobiano. Observações paralelas foram registradas para os isolados JVD 04 e JVD 05. Estes demonstraram um perfil de resistência exclusivamente ao ácido nalidíxico, enquanto exibiram sensibilidade a todos os demais antimicrobianos avaliados. Esta análise detalhada contribui para o entendimento do perfil de resistência antimicrobiana.

Tabela 5 – Distribuição do Padrão de Suscetibilidade Antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobianos	JVD	JVD	JVD	JVD	JVD	JVD
	03	04	05	06	07	08
Tobramicina	S	S	S	S	S	S
Imepenem	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	I
Levofloxacino	S	S	S	S	I	I
Polimixina B	S	S	S	S	SC	SC
Norfloxacino	S	S	S	S	S	S
Meropenem	S	S	S	R	S	R
Aztreonam	S	S	S	R	R	R
Ofloxacina	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S	S
Piperacilina e Tazobactam	S	S	S	S	I	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S
Ácido Nalidíxico	I	R	R	R	R	R
Cefepime	S	S	S	R	R	RC
Ceftazidima	S	S	S	I	S	R

S - sensível; I- intermediário; R- resistente; SC- sensível com crescimento; RC- resistente com crescimento

Fonte: elaboração própria

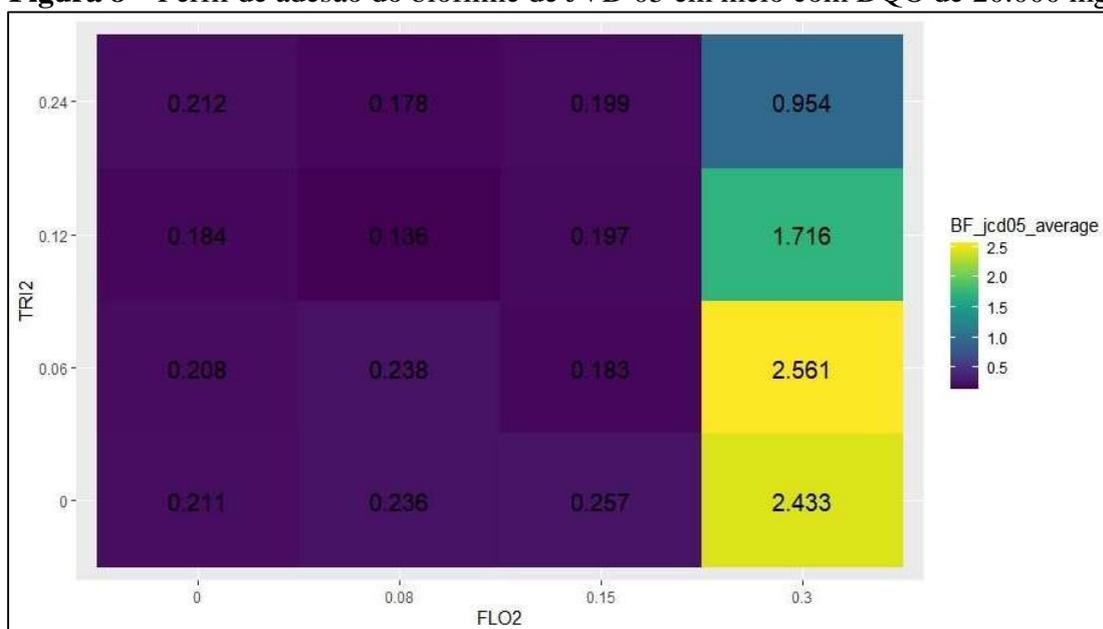
A linhagem JVD 06 exibiu resistência a quatro agentes antimicrobianos específicos, a saber: meropenem, ácido nalidíxico, cefepime e aztreonam. Revelou também um perfil de resistência antimicrobiana ainda mais complexo com a identificação de uma resposta intermediária ao antibiótico ceftazidima. A linhagem JVD 06, cujo perfil de resistência antimicrobiana se mostrou ímpar, foi isolada de uma fonte ambiental crítica: a torneira da lavanderia do hospital veterinário.

JVD 07 revelou um perfil complexo e preocupante de resistência antimicrobiana. Este isolado demonstrou resistência a três antimicrobianos distintos: aztreonam, ácido nalidíxico e cefepime. Além disso, foi observada uma resposta de grau intermediário ao levofloxacina e à combinação de piperacilina e tazobactam. A análise de JVD 08, isolada de um açude assim como a linhagem JVD 07, revelou um perfil de resistência antimicrobiana semelhante, distinguindo-se como o isolado mais resistente entre as linhagens estudadas. Este isolado apresentou resistência a uma gama de antimicrobianos, incluindo meropenem, aztreonam, ácido nalidíxico, cefepime e ceftazidima. Além disso, mostrou uma resposta de grau intermediário à levofloxacina e à ciprofloxacina como demonstrado na Tabela 5.

5.5. Ensaio *in vitro* da formação do biofilme

Inicialmente testou-se um meio com DQO de 20.000 mg/L com os isolados JVD 05, JVD 07 e JVD 08 com fins de observar tendências sobre adesão e inibição das células em biofilme, nas combinações dos antimicrobianos e isoladamente. Os resultados foram similares. Para o isolado JVD 05 observou-se que sulfametoxazol+trimetoprima em concentrações de 0,06, 0,12 e 0,24 mg/mL, bem como de florfenicol em concentrações de 0,08 e 0,15 mg/mL, resultaram numa inibição estatisticamente significativa dos biofilmes, com a absorbância variando de 0,136 a 0,257. Estes dados estão apresentados na Figura 8, na qual os valores na cor roxa permaneceram estatisticamente iguais em todas essas combinações.

Figura 8 – Perfil de adesão do biofilme de JVD 05 em meio com DQO de 20.000 mg/L



Eixo y da Figura representa as concentrações de sulfametoxazol+trimetoprima, 0,06, 0,12, 0,24 mg/mL. No eixo x representa as concentrações de florfenicol em 0,08, 0,15 e 0,30 mg/mL. Os valores de cada quadrado corresponde ao valor em absorbância de redução (cor roxa) ou formação do biofilme nas cores (amarelo, verde e azul).

Fonte: elaboração própria

Por outro lado, a adesão do biofilme foi classificada como alta, nas combinações de concentrações de florfenicol 0,30 mg/mL sem a adição de sulfametoxazol+trimetoprima. Especificamente, quando florfenicol foi testado, isoladamente, na concentração de 0,30 mg/mL, observou-se uma taxa de adesão do biofilme de 92% (absorbância 2,433). Surpreendentemente, a associação com sulfametoxazol+trimetoprima nesta concentração de florfenicol resultou em uma leve

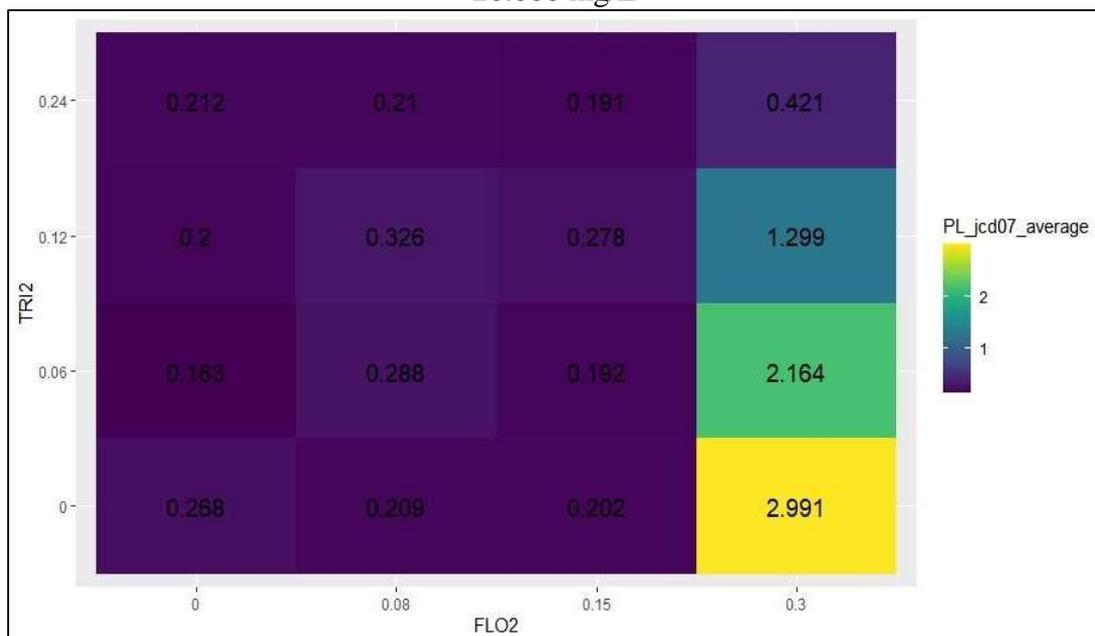
variação nas taxas de adesão: uma combinação de 0,06 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima com 0,30 mg/mL de florfenicol apresentou uma taxa de adesão de 92,3%, enquanto a combinação de 0,12 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima com 0,30 mg/mL de florfenicol resultou em uma taxa de forte adesão de 88,5%, a adesão corresponde as cores amarelo e verde da Figura 8.

Quanto a formação de biofilmes, em JVD 05 constatou-se que a variação nas concentrações de antimicrobianos influenciou o comportamento do biofilme, quanto à adesão e inibição. Foi observado que a combinação de 0,15 mg/mL de florfenicol e 0,12 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima resultou na mais efetiva atividade antibiofilme, evidenciando uma inibição de 83,3% na formação de biofilme. Em contraste, a maior adesão foi registrada na presença de 0,30 mg/mL de florfenicol e na ausência de sulfametoxazol+trimetoprima.

Para o isolado JVD 07, quando administrado sulfametoxazol+trimetoprima em concentrações de 0,06, 0,12 e 0,24 mg/mL, isoladamente, observou-se uma inibição na formação de biofilme, caracterizada por uma não adesão ou, em alguns casos, uma adesão significativamente baixa (<40%). Similarmente, a aplicação de florfenicol nas concentrações de 0,08 e 0,15 mg/mL com 0,06, 0,12 e 0,24 mg/mL sulfametoxazol+trimetoprima também resultou em inibição (Figura 9).

Demonstrando a mesma característica da linhagem anterior, observou-se um aumento marcante na adesão de biofilmes quando o florfenicol foi utilizado na concentração de 0,30 mg/mL, seja isoladamente ou em combinação com sulfametoxazol+trimetoprima. Na ausência de sulfametoxazol+trimetoprima, a concentração de 0,30 mg/mL de florfenicol apresentou uma taxa de adesão de biofilme de 92,5%. Interessantemente, a adição de sulfametoxazol+trimetoprima, esta configuração impactou as taxas de adesão: a combinação de 0,06 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima com 0,30 mg/mL de florfenicol registrou uma taxa de adesão de 90,9% e a combinação de 0,12 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima com 0,30 mg/mL de florfenicol resultou numa taxa de adesão de 81,1%.

Figura 9 – Perfil de adesão do biofilme do isolado JVD 07 em meio com DQO de 20.000 mg/L

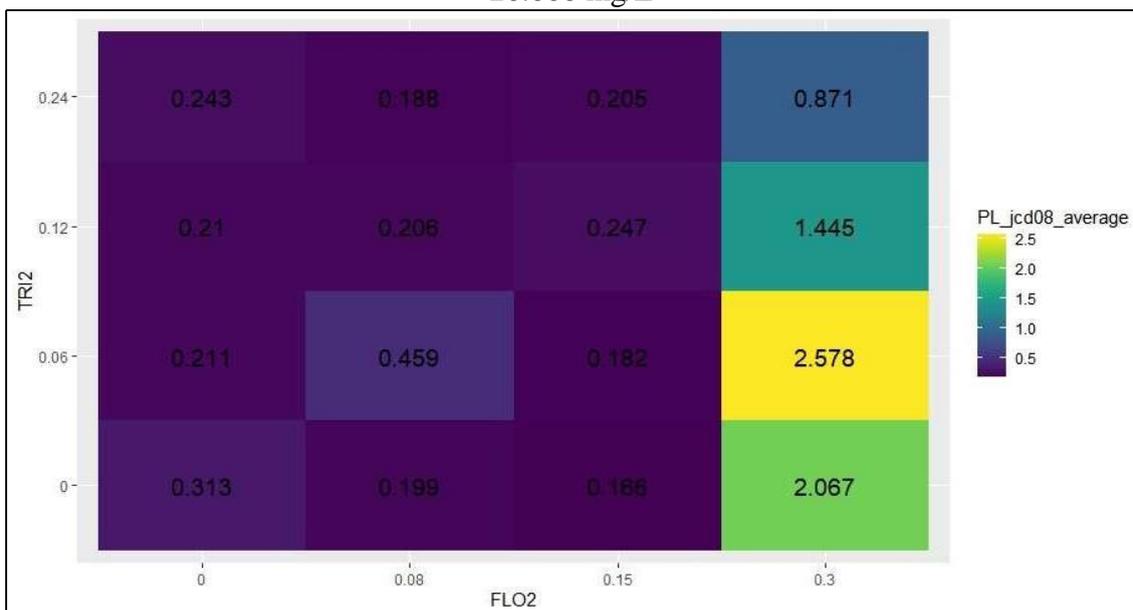


Eixo y da Figura representa as concentrações de sulfametoxazol+trimetoprima, 0,06, 0,12, 0,24 mg/mL. No eixo x representa as concentrações de florfenicol em 0,08, 0,15 e 0,30 mg/mL. Os valores de cada quadrado correspondem ao valor em absorbância de redução (cor roxa) ou formação do biofilme nas cores (amarelo, verde e azul).

Fonte: elaboração própria (2023)

Para o isolado JVD 08, observou-se inibição de 90,8% da adesão, quando exposto à combinação de 0,08 mg/mL de florfenicol e 0,24 de sulfametoxazol+trimetoprima (Figura 10). Por outro lado, foi identificada maior adesão (87,1%) na associação de 0,30 mg/mL de florfenicol e 0,12 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima, destacado em amarelo (Figura 10). Esses resultados seguiram a mesma tendência observada anteriormente, em que florfenicol favoreceu o crescimento e adesão de biofilmes.

Figura 10 – Perfil de adesão do biofilme do isolado JVD 08 em meio com DQO de 20.000 mg/L



Eixo y da Figura representa as concentrações de sulfametoxazol+trimetoprima, 0,06, 0,12, 0,24 mg/mL. No eixo x representa as concentrações de florfenicol em 0,08, 0,15 e 0,30 mg/mL. Os valores de cada quadrado corresponde ao valor em absorvância de redução (cor roxa) ou formação do biofilme nas cores (amarelo, verde e azul).

Fonte: elaboração própria (2023).

Assim, para uma DQO de 20.000 mg/L, as linhagens exibiram características semelhantes de adesão ao biofilme e crescimento. Nas concentrações que envolvem sulfametoxazol+trimetoprima (eixo y), foi observada uma redução da adesão, ao aumentar a concentração da sulfa na presença da maior concentração de florfenicol. A (Tabela 6) resume os valores expressos em porcentagens, das Figuras 8, 9 e 10.

Dada a propensão à adesão observada em resposta à maior concentração de florfenicol, essas linhagens foram selecionadas para experimentos adicionais, com variações na DQO de forma a simular em águas com diferentes níveis de contaminação (20.000 e 2.000 mg/L), comparados à uma água bruta (400 mg/L) e as combinações florfenicol – sulfametoxazol+trimetoprima (F/S) de 0,00/0,24; 0,30/0,00 e 0,30/0,24 mg/mL.

Com DQO de 400 mg/L, observou-se uma maior redução da adesão celular no isolado JVD 08 (34%) na combinação 0,00/0,24 mg/mL de FFC/SXT, enquanto a maior adesão ocorreu em JVD 07, com 4,5%, em concentrações de (0,30/0,24 mg/mL). No DQO de 2.000 mg/L, a maior redução foi observada no isolado JVD 08 (42,8%), e a maior adesão, comparada ao controle foi de 15,8% no isolado JVD 07, ambos os resultados na combinação FFC/SXT de 0,30/0,24 mg/mL. Na repetição do experimento com DQO de

20.000 mg/L, observou-se que a maior redução ocorreu com o isolado JVD 08 (45,8%) na combinação FFC/SXT de 0,30/0,24 mg/mL, enquanto a maior adesão celular foi registrada no isolado JVD 07 (11,8%) na combinação FFC/SXT de 0,30/0,00 mg/mL.

Tabela 6 – Avaliação da adesão e inibição de biofilme em meio com DQO de 20.000 mg/L.

Condições			
FFC/SXT (mg/mL)	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,00/0,24	3,9	-17,3	-34,6
0,00/0,12	9,2	-2,3	-33,5
0,00/0,06	2,9	-56,6	-8,4
0,30/0,00	92,0	92,5	-54,7
0,30/0,24	71,0	69,8	75,9
0,30/0,12	88,5	81,1	87,1
0,30/0,06	92,3	90,9	86,3
0,15/0,00	-48,9	-68,4*	-75,7
0,15/0,24	-17,9	-14,9	-79,8
0,15/0,12	-83,3*	-52,0	-68,5
0,15/0,06	-30,3	-31,0	-68,1
0,08/0,00	45,5	-6,7	-56,3
0,08/0,24	14,3	16,1	-90,8*
0,08/0,12	-65,0	42,4	-56,3
0,08/0,06	-2,1	14,8	-21,5

FFC- florfenicol, SXT- sulfametoxazol+trimetoprima. Sinais negativos indicam redução da adesão (%) em comparação ao controle. Com asterisco (*) estão destacadas as maiores reduções do biofilme.

Fonte: elaboração própria

Em resumo, as maiores reduções ocorreram com DQO mais altas e o florfenicol quando presente colabora nesse processo. Apesar disso, a maioria das reduções foram consideradas fracas.

Tabela 7 – Perfil de adesão de isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* expostas aos antimicrobianos em diferentes DQO

DQO (mg/L)	FFC/SXT (mg/mL)	Isolados / Adesão (%)		
		JVD 05	JVD 07	JVD 08
400	0,00/0,24	-1,2	1,3	-34,0
400	0,30/0,00	-18,4	3,1	-33,8
400	0,30/0,24	-22,3*	4,5	-36,7*
2000	0,00/0,24	0,8	-1,2	-24,1
2000	0,30/0,00	-14,1*	-2,1*	-41,5
2000	0,30/0,24	-10,1	15,8	-42,8*
20000	0,00/0,24	0,9	-13,7	-38,3
20000	0,30/0,00	11,8	-37,9*	-31,9
20000	0,30/0,24	-7,7*	-31,1	-45,6*

FFC – florfenicol, SXT- sulfametoxazol+trimetoprima; números em negrito representam aumento da adesão, comparada ao controle e sinais negativos, redução do biofilme. As maiores para cada DQO, estão destacadas com o asterisco (*); Fonte: elaboração própria

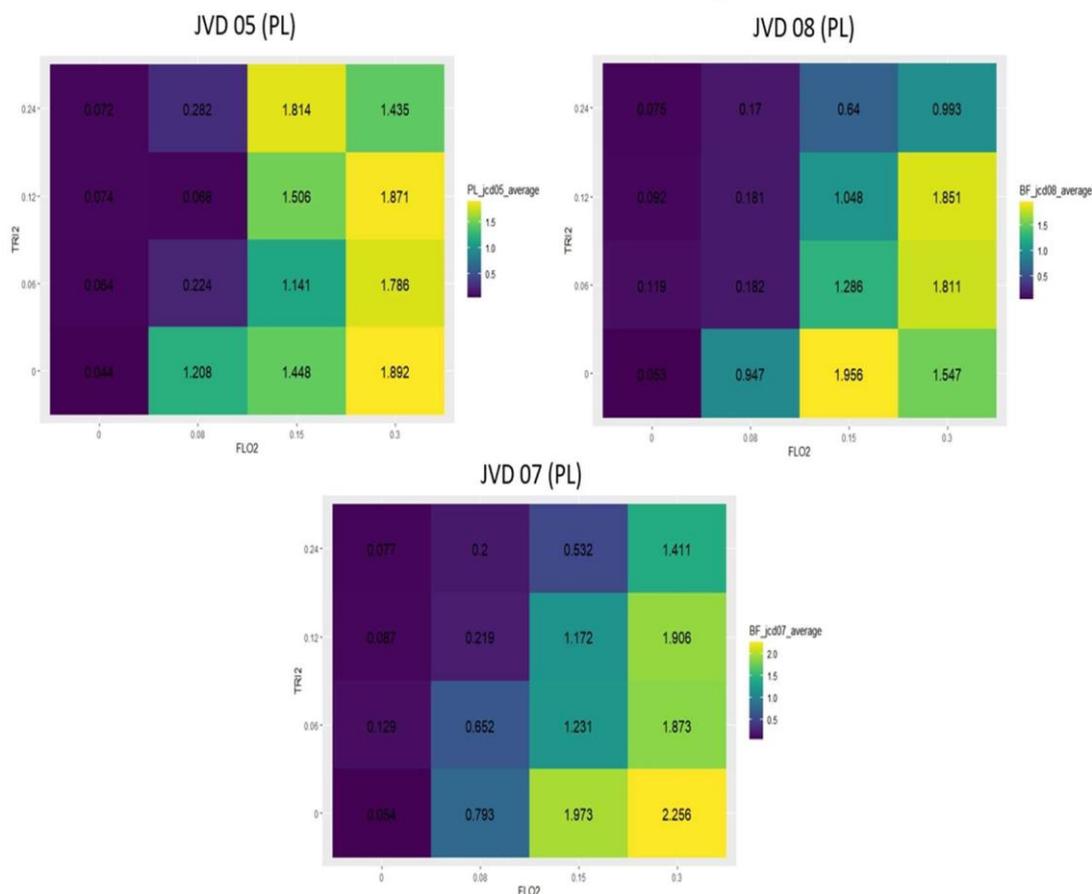
5.6. Ensaio células planctônicas em DQO de 20.000 mg/L

Na quantificação da população planctônica foi observada uma tendência de aumento na densidade dessas células. Os valores de absorvância de JVD 05, JVD 07 e JVD 08 foram mais altos, em comparação com o controle estabelecido. Esses aumentos variaram de 6,1% até 180%, conforme observado na Tabela 8. Entretanto, as reduções mais acentuadas ($p= 5,367 \times 10^{-6}$) foram observadas na presença de sulfametoxazol+trimetoprima e ausência de florfenicol. Além disso, de maneira geral, concentrações mais elevadas de florfenicol estiveram associadas a uma maior densidade de células planctônicas.

Para o isolado JVD 05, foi observado que sulfametoxazol+trimetoprima em concentrações de 0,06, 0,12 e 0,24 mg/mL, bem como florfenicol em concentrações de 0,08, 0,15 e 0,30 mg/mL, resultaram em aumento significativo de células, com valores de absorvância variando de 0,068 (cor roxa) a 1,892 (cor amarela) como observado na Figura 11, representando um aumento de 10,7% até 180,4%, respectivamente. Foi observado que na ausência de florfenicol (0/0,06; 0/0,24 mg/mL), esse aumento foi significativamente menor (absorvância de 0,064 e 0,072), representando aumentos de apenas 10,7% e 18% em comparação quando expostos ao florfenicol. Contudo, na presença de florfenicol, sozinho ou em combinação com sulfametoxazol+trimetoprima, houve um considerável

aumento de células, como observado nas concentrações de 0,15/0,12 mg/mL, resultando em um aumento de 180,4% (absorbância de 1.506).

Figura 11 – Perfil de células planctônicas de JVD 05, JVD 07 e JVD 08 em meio com DQO de 20.000 mg/L



Eixo y da Figura representa as concentrações de sulfametoxazol+trimetoprima, 0,06, 0,12, 0,24 mg/mL. No eixo x representa as concentrações de florfenicol em 0,08, 0,15 e 0,30 mg/mL. Os valores de cada quadrado representam o valor em absorbância da densidade celular de células planctônicas para cada combinação. A cor roxa, representa valores estatisticamente semelhantes ao controle. Amarelo, verde e azul, representam aumento no número de células planctônicas

Fonte: elaboração própria (2023)

Esse padrão observado em JVD 05 foi repetido nas demais linhagens, JVD 07 e JVD 08, onde os maiores aumentos foram registrados nas concentrações de florfenicol. Em JVD 07, houve um aumento de 127,7%, (Tabela 8) com uma absorbância de 1.172 na concentração de 0,15/0,12 mg/mL de florfenicol. Já em JVD 08, o aumento foi de 97,6%, com uma absorbância de 1,282 na concentração de 0,30/0 mg/mL de florfenicol e sulfametoxazol+trimetoprima.

Tabela 8 – Dinâmica do número de células planctônicas de isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* expostas aos antimicrobianos em meio com DQO de 20.000 mg/L

FFC/SXT (mg/mL)	Aumento (%)		
	JVD 05	JVD 07	JVD 08
0,00/0,24	18,0	6,1	20,0
0,00/0,12	33,3	25,3	41,1
0,00/0,06	10,7	45,1	49,5
0,30/0,00	97,4	97,0	97,6
0,30/0,24	97,1	95,4	95,4
0,30/0,12	97,1	96,9	96,7
0,30/0,06	96,8	96,7	96,9
0,15/0,00	95,8	96,9	97,1*
0,15/0,24	97,3	86,3	87,0
0,15/0,12	180,4*	127,7*	81,2
0,15/0,06	95,1	95,4	95,4
0,08/0,00	95,6	88,6	96,3
0,08/0,24	86,3	68,7	72,7
0,08/0,12	21,9	78,4	39,8
0,08/0,06	72,4	90,6	69,1

FFC – florfenicol, SXT- sulfametoxazol+trimetoprima valores acompanhados de asterisco (*) representam os maiores aumentos de células planctônicas, comparadas ao controle.

Fonte: elaboração própria (2023)

5.7. Ensaio células planctônicas em DQO de 400, 2.000 e 20.000 mg/L

As células planctônicas em diferentes valores de DQO apresentaram aumentos consideravelmente reduzidos em comparação com o primeiro teste piloto. Os maiores aumentos foram observados em DQO de 400 para JVD 07, com aumentos de 31,7% e 25,3% em concentrações de 0,30/0,24 mg/mL de florfenicol/sulfametoxazol+trimetoprima e de 0,30/0 mg/mL de florfenicol, respectivamente.

Tabela 9 – Dinâmica do número de células planctônicas de isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* expostas aos antimicrobianos em diferentes DQO

DQO (mg/L)	FFC/SXT (mg/mL)	Isolados /Aumento / Redução (%)		
		JVD 05	JVD 07	JVD 08
400	0,00/0,24	20,7	24,4	9,9
400	0,30/0,00	16,9	25,3*	9,1
400	0,30/0,24	14,1	31,7*	-1,1
2000	0,00/0,24	29,8*	9,4	7,2
2000	0,30/0,00	11,4	16,9	10,9
2000	0,30/0,24	-1	11,5	2,7
20000	0,00/0,24	17,4	14,6	14,8
20000	0,30/0,00	17,4	19,4	19,8
20000	0,30/0,24	5,9	13,8	5,3

FFC – florfenicol, SXT- sulfametoxazol+trimetoprima; valores acompanhados de asterisco (*) representam aumento no número de células planctônicas, comparada ao controle.

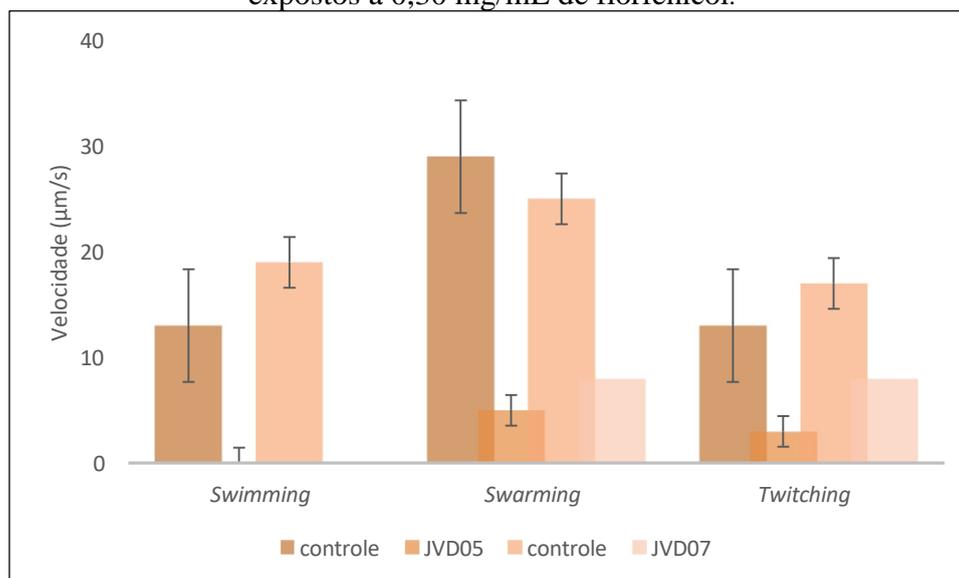
Fonte: elaboração própria (2023)

5.8. Ensaio de Motilidade

Na presença de florfenicol (0,30 mg/mL), foi observada uma notável diminuição na motilidade do isolado JVD 05 em um período de 24 h. Os valores da corrida para os controles de motilidades dos tipos *swimming* (flagelo), *swarming* (flagelo) e *twitching* (fímbria) foram de 13, 29 e 13 mm, valores esses que na presença de florfenicol reduziram para, 0, 5 e 3 mm, observando reduções de 100%, 82,8% e 77% como apresentado na Figura 10. Observou-se uma redução de 100% na velocidade de corrida de natação na presença de florfenicol.

Para o isolado JVD 07, os resultados demonstraram uma diminuição notável na motilidade em resposta ao tratamento com florfenicol. A velocidade de corrida no controle foi de 0,22 $\mu\text{m/s}$. No entanto, na presença de florfenicol, não houve motilidade do tipo *swimming* (0,00 $\mu\text{m/s}$). Na motilidade do tipo *swarming* o controle apresentou deslocamento de 25 mm, a presença de florfenicol reduziu para 8 mm, representando uma redução de 68%. De maneira similar, a motilidade do tipo *twitching* foi reduzida em 53% (17 mm no controle e 8 mm no teste).

Figura 11 – Velocidade de corrida dos isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a 0,30 mg/mL de florfenicol.

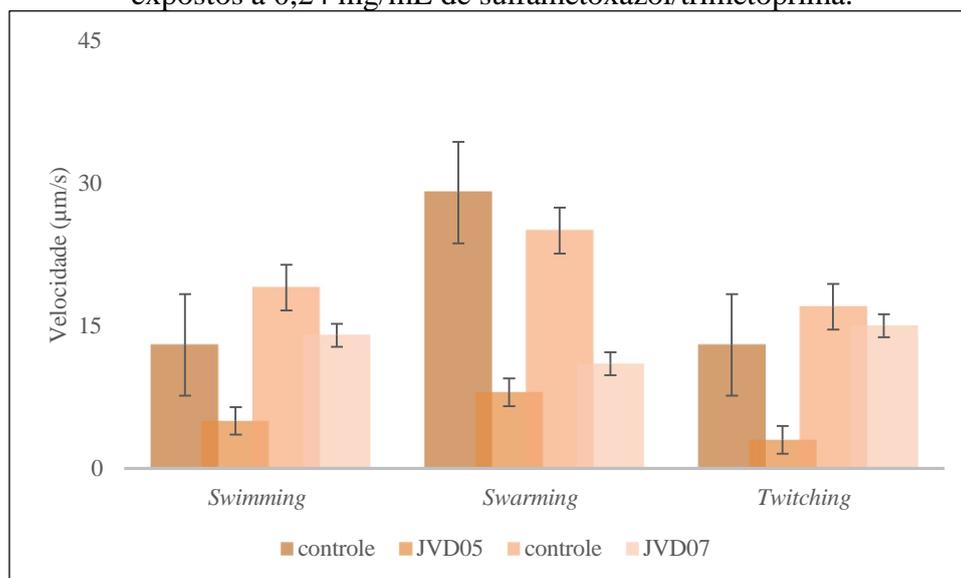


Fonte: elaboração própria (2023)

Além do florfenicol, a influência da combinação de sulfametoxazol+trimetoprima (0,24 mg/mL) na motilidade dos isolados JVD 05 e JVD 07 foi avaliada, como observado na Figura 11. Os resultados indicaram uma redução na motilidade para ambas, embora com variações. No estudo da influência do sulfametoxazol+trimetoprima na motilidade da linhagem JVD 05, observou-se uma diminuição notável da corrida para todas as modalidades de motilidade avaliadas. Na motilidade tipo *swimming*, essa corrida foi reduzida de 13 para 5 mm, (62%). Em relação à motilidade do tipo *swarming*, foi registrada uma redução significativa da 29 para 8 mm (72%). Da mesma forma, a motilidade das células *twitching* apresentou uma redução comparada ao controle, de 77%, ou seja, 13 para 3 mm.

Já o isolado JVD 07, na combinação de sulfametoxazol+trimetoprima também reduziu a motilidade, embora em uma escala menos acentuada do que o observado com o isolado JVD 05. Especificamente, na modalidade de motilidade do tipo *swimming*, a JVD 07 diminuiu 26% (de 19 para 14 mm). A corrida das células tipo *swarming* reduziu um pouco mais, 56% (de 25 para 11 mm). Finalmente, a corrida das células tipo *twitching* exibiu uma ligeira redução de 12%, passando de 17 para 15 mm.

Figura 12 – Velocidade de corrida dos isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* expostos a 0,24 mg/mL de sulfametoxazol/trimetoprima.



Fonte: elaboração própria (2023)

6. DISCUSSÃO

6.1. Variação fenotípica dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os aspectos fenotípicos de isolados de *P. aeruginosa* em resposta à exposição a antimicrobianos desenvolvidos para uso veterinário. É importante notar que, embora possa haver mudanças na legislação sobre o uso de antimicrobianos, isso pode não se refletir imediatamente na presença de microrganismos resistentes em um determinado ambiente ou contexto. A resistência antimicrobiana é um problema complexo e multifacetado, influenciado por uma variedade de fatores, incluindo o uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos, animais e na agricultura, bem como práticas inadequadas de higiene e saneamento. Esta abordagem está alinhada com a necessidade urgente de pesquisas que abordem a resistência a formulações de antimicrobianos utilizados na medicina veterinária. Em razão da global utilização de antimicrobianos veterinários e sua persistente detecção em solos, ambientes aquáticos e animais destinados à produção alimentar. Tais esforços colaboram não apenas na esfera da saúde humana, mas também na saúde animal, em conformidade com a perspectiva *One Health* (Ahmad *et al.*, 2023; Carvalho; Mariotini, 2020).

P. aeruginosa foi encontrada em uma ampla variedade de locais, desde água destilada até solos contaminados, pias de hospitais, mar aberto, poços de petróleo, solo contaminado com pesticidas, saídas de água, chuveiros, flores, animais, seres humanos e até mesmo em instrumentos cirúrgicos e implantes médicos (Bayssari *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2007; Warburton *et al.*, 1994). Além disso, destaca-se que *P. aeruginosa* é conhecida por sua capacidade de adaptação, incorporando novos elementos genéticos e ajustando seu metabolismo de acordo com o ambiente (Mathee *et al.*, 2008). Isso é facilitado pela produção de vários fatores de virulência e moléculas secretoras, como fenazinas, enzimas líticas e ramnolipídios (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

Embora reconhecida como um contaminante frequente em ambientes hospitalares, *P. aeruginosa* também representa uma preocupação significativa em ecossistemas aquáticos. Esta preocupação é embasada por uma série de estudos que evidenciam a presença deste patógeno em tais ambientes (Hajjartabar, 2004; Webb *et al.*, 2004). A persistência e a detecção de *P. aeruginosa* em habitats aquáticos não só amplia o escopo de sua relevância epidemiológica, mas também desafia a compreensão

dos mecanismos de adaptação e persistência desta bactéria em diferentes ambientes. Ela demonstra uma capacidade notável de prosperar tanto em atmosferas com teores normais de oxigênio como em ambientes com baixa concentração de oxigênio (Oraezukor *et al.*, 2021). Esta característica permite que colonize uma ampla gama de ambientes, naturais e não selvagens, demonstrando sua adaptabilidade robusta e versatilidade ecológica (Mao *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos nesse estudo, em termos da produção de piocianina pelos isolados de *P. aeruginosa*, são consistentes com a literatura (Nowroozi *et al.*, 2012), isto é, uma alta prevalência de exibição do pigmento em isolados clínicos (95%) e ambientais (100%). Além disso, é interessante ressaltar que a produção de piocianina pode ser influenciada pelo ambiente em que a bactéria está crescendo. Contudo, Legnani *et al.* (1999) observaram que a produção de piocianina é menor quando a bactéria está em contato com água, em comparação com meios de cultura enriquecidos ou solo. Isso sugere que o ambiente pode desempenhar um papel importante na regulação da produção de piocianina.

De acordo com Belenky *et al.* (2015), *P. aeruginosa* pode desenvolver uma tolerância coletiva aos antibióticos, mediada pela piocianina. Todos os antibióticos expostos às linhagens provocaram o aumento da concentração de piocianina e ela por ser expressa, conferiu tolerância a todos os antibióticos, com exceção da polimixina B, que é ativa contra a bactéria porque atua em nível da membrana. Em complemento, Zhu *et al.* (2019) observaram que piocianina conferiu tolerância a todos os antibióticos testados. A presença ou a produção do pigmento reduziu a suscetibilidade aos efeitos dos antibióticos, indicando que existe um papel crucial do pigmento na defesa global contra antimicrobianos, sem ainda desconhecido o mecanismo.

A produção de piocianina, é uma característica exclusiva da *P. aeruginosa*, sendo esta bactéria a única fonte natural desse composto. Cerca de 90-95% dos espécimes de *P. aeruginosa* sintetizam piocianina (Abdelaziz *et al.*, 2023; Mavrodi *et al.*, 2001; Saleem *et al.*, 2021). A expressão de piocianina por *P. aeruginosa* está diretamente relacionada à sua capacidade de resposta a pressões seletivas ambientais (Bahari *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2008). Além de desempenhar um papel crucial na promoção da viabilidade celular em ambientes desafiadores, a piocianina contribui significativamente para a colonização e persistência da *P. aeruginosa*. A piocianina também está associada à formação de

biofilme, um modo de vida bacteriano que confere resistência a antimicrobianos e protege as células bacterianas (Das *et al.*, 2013; Shouman *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2019).

Ademais, uma membrana hidrofóbica indica uma falta de afinidade por moléculas de água, tornando mais fácil a passagem de moléculas hidrofóbicas através da membrana plasmática. A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana emerge como um fator crucial que influencia a adesão bacteriana a várias superfícies (Mirani *et al.*, 2018 Vij *et al.*, 2020). No caso de *P. aeruginosa*, sua resistência intrínseca é atribuída à baixa permeabilidade de sua membrana externa (Strateva; Yordanov, 2009). Estima-se que a permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* seja de 10 a 100 vezes menor do que a de *Escherichia coli*, apresentando uma menor capacidade de absorção (Breidenstein *et al.*, 2011).

Microrganismos que exibem elevada hidrofobicidade tendem a aderir mais eficientemente a superfícies com propriedades semelhantes, por exemplo dispositivos médicos implantáveis, tais como cateteres, válvulas cardíacas mecânicas ou marcapassos, fabricados a partir de materiais hidrofóbicos (como silicone, plástico, teflon *et cetera*). Microrganismos hidrofóbicos têm uma maior propensão para aderir a esses dispositivos (Krasowska; Sigler, 2014). Esta tendência de adesão está intrinsecamente ligada às propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas dos microrganismos. Adicionalmente, foi documentada uma preferência microbiana por superfícies mais porosas, como indicado em estudos anteriores (Bos *et al.*, 2000; Chang; Merritt, 1994; Scheuerman *et al.*, 1988). Em ambientes aquosos, a maioria das células planctônicas apresenta uma carga negativa na superfície (Poortinga *et al.*, 2001). Observa-se que, quanto maior a hidrofobicidade da célula, mais intensa tende a ser sua adesão a uma superfície específica (Collin *et al.*, 2020).

6.2. Ensaio de susceptibilidade a antimicrobianos

A substância que apresentou a mais elevada taxa de resistência foi o ácido nalidíxico, com um índice de 83%, sendo que cinco dos seis espécimes isolados demonstraram resistência a este antibiótico. Nos estudos realizados por Maia *et al.* (2009), que envolveram *P. aeruginosa* isoladas de pescados e frangos, também observou um alto índice de resistência ao ácido nalidíxico entre os isolados, alcançando 96,8%. Essa identificação de resistência ao ácido nalidíxico, um antibiótico frequentemente utilizado em animais produtores de alimentos para controle, prevenção e tratamento de

doenças, bem como seu uso como promotor de crescimento, destaca uma preocupação significativa em termos de saúde única e manejo de resistência a antimicrobianos (Maia *et al.*, 2009). Os isolados de torneiras (JVD 03, 04 e 05) demonstraram um perfil de sensibilidade mais amplo em comparação com os isolados selvagens. Por outro lado, estes isolados exibiram uma maior tendência à resistência quando comparados aos isolados de torneiras, eles apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos.

No geral, os espécimes apresentaram resistência a vários antimicrobianos beta-lactâmicos, entre eles, meropenem, aztreonam, cefepime e ceftazidima. Isso sugere que a resistência a β -lactâmicos é comum entre *P. aeruginosa*. Esta resistência é atribuída a fatores intrínsecos, como a baixa permeabilidade da membrana e a produção da enzima β -lactamase AmpC (Ansari *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2012; Rafiee *et al.*, 2014). A exposição ambiental aos antimicrobianos contribui para o aumento da resistência bacteriana, uma vez que proporciona condições para a seleção e propagação de isolados resistentes (Singer *et al.*, 2016). Além disso, o uso de antimicrobianos seja em ambientes hospitalares, seja na comunidade, desempenha um papel crucial na seleção de bactérias resistentes a esses agentes terapêuticos (Corrêa *et al.*, 2003). Na perspectiva *One Health*, existe um consenso crescente de que a análise da infecciosidade e da resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa* deve adotar a abordagem de Saúde Única, levando em conta sua colonização em uma variedade de ecossistemas ambientais (Laborda *et al.*, 2021).

Durante os estágios iniciais dos ensaios fenotípicos, foi observada uma homogeneidade nos padrões apresentados pelas linhagens analisadas. No entanto, optou-se por selecionar três isolados para investigar a formação do biofilme. O isolado JVD05 foi escolhido devido à sua eficácia na produção de piocianina, enquanto os isolados JVD07 e JVD08, provenientes de um ambiente aquático, foram selecionados por apresentarem distintos perfis de resistência, conforme evidenciado nos testes de susceptibilidade. Essa seleção é de particular relevância, pois destaca a importância das instalações hospitalares como potenciais reservatórios para patógenos resistentes a múltiplos medicamentos.

6.3. Avaliação de células planctônicas

Foi relatado por Balaban *et al.* (2004) e Lewis (2007) que vários mecanismos moleculares desempenham papéis cruciais na resistência das bactérias aos

antimicrobianos, podendo atuar de forma isolada ou em conjunto para conferir essa capacidade adaptativa. Esses mecanismos incluem a multiplicação "lenta", resposta SOS, respostas ao choque frio e estresse, desintoxicação e modificações na permeabilidade das membranas. Esses processos permitem que as bactérias enfrentem e proliferem à exposição aos compostos antimicrobianos, adaptando-se ao ambiente hostil.

O aumento significativo na densidade de células planctônicas, variando de 6,1% a 180% em relação ao controle, indica um cenário propício para a migração e multiplicação das células bacterianas sob as condições experimentais estabelecidas. Esse fenômeno sugere que as condições do experimento podem ter estimulado a proliferação bacteriana, resultando em um incremento na população total de células planctônicas ao longo do tempo. Essa observação é congruente com os mecanismos adaptativos frequentemente observados em bactérias, como a multiplicação "lenta" resultando em "persistências" e as respostas ao estresse. Tais mecanismos, discutidos por Mangalappalli-Illathu *et al.* (2008), podem promover a resiliência e a proliferação bacteriana em ambientes desafiadores.

O aumento observado nas células planctônicas de *P. aeruginosa* pode ser interpretado como um indicador dos riscos associados à multiplicação microbiana. A rápida proliferação bacteriana pode levar à disseminação de doenças infecciosas e à contaminação de ambientes, produtos e superfícies, representando uma ameaça significativa à saúde pública. Além disso, a multiplicação bacteriana está frequentemente associada à formação de biofilmes. Esses riscos são apoiados por informações disponíveis na literatura: Belenky *et al.* (2015) demonstraram que a multiplicação bacteriana induzida por antibióticos pode resultar em perturbações metabólicas tóxicas que causam danos celulares, enquanto Zhu *et al.* (2019) ressaltaram que a multiplicação bacteriana pode levar à produção de metabólitos tóxicos, como a piocianina, contribuindo para a resistência universal aos antibióticos em *P. aeruginosa*.

6.4. Ensaio da formação do biofilme

Durante experimentos laboratoriais, ao expor isolados de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos, observou-se que o aumento na concentração de sulfametoxazol+trimetoprima na presença de florfenicol resultou em uma maior inibição da formação do biofilme. Esse achado sugere que a combinação desses antimicrobianos pode ter um efeito inibitório sobre a capacidade da *P. aeruginosa* de formar biofilme, isto

é, uma possibilidade de que a exposição ao florfenicol, um antibiótico bacteriostático que inibe a síntese de proteínas, pode potencializar os efeitos da sulfametoxazol+trimetoprima de várias maneiras. Primeiramente, sugere-se que haja um sinergismo na inibição da síntese proteica. O florfenicol e a trimetoprima atuam em diferentes estágios desse processo: o florfenicol interfere com a formação do peptidil transferase no ribossomo, bloqueando a ligação dos aminoácidos durante a síntese proteica, enquanto a trimetoprima afeta a síntese dos precursores essenciais para essa produção (Ren *et al.*, 2017). Dessa forma, acredita-se que a combinação desses dois antimicrobianos pode levar à uma inibição mais completa da síntese proteica bacteriana, comprometendo a capacidade das células bacterianas de produzirem os componentes necessários para a formação do biofilme. A consequência desse efeito sinérgico poderia ser uma redução significativa na formação do biofilme, especialmente quando a concentração de sulfametoxazol+trimetoprima é aumentada na presença de florfenicol.

A exposição ambiental aos antimicrobianos contribui para o aumento da resistência bacteriana, uma vez que proporciona condições para a seleção e propagação de isolados resistentes (Singer *et al.*, 2016). Além disso, o uso de antimicrobianos seja em ambientes hospitalares, seja na comunidade, desempenha um papel crucial na seleção de bactérias resistentes a esses agentes terapêuticos (Corrêa *et al.*, 2003). Hoiby *et al.* (2010) observaram que concentrações subinibitórias de certos antimicrobianos, como a ciprofloxacina, podem induzir a formação de biofilme em *P. aeruginosa*.

Observou-se que todos os isolados, quando expostos ao florfenicol, especialmente na concentração mais alta, 0,30 mg/mL, tiveram um aumento na formação de biofilme. Esses resultados sugerem uma possível resistência ao antibiótico por parte desses isolados. Uma hipótese para explicar essa resistência é que esses isolados podem ter desenvolvido mecanismos de resistência, como a presença de genes de resistência ou a ativação de sistemas de efluxo que removem ativamente o florfenicol da célula, reduzindo sua eficácia (Mutuku *et al.*, 2022). Além disso, é possível que as bactérias tenham adaptado seus mecanismos de formação de biofilme para se protegerem do florfenicol, tornando-se mais resilientes à sua ação. Esses mecanismos podem incluir mudanças na expressão de genes relacionados à formação de biofilme ou alterações na composição e estrutura do biofilme para impedir a entrada do antibiótico (Rattanapanadda *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2018).

A detecção do gene determinante de resistência ao florfenicol, *floR*, foi detectado inicialmente em *Vibrio damsela*, um patógeno de peixes, sugere fortemente a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos de bactérias aquáticas para patógenos veterinários de importância humana e terrestre (Bolton *et al.*, 1999). Essa associação molecular pode ser correlacionada com a observação de linhagens bacterianas mais resistentes que formaram biofilme na presença de florfenicol. O gene *floR*, reconhecido como responsável pela resistência ao florfenicol, é conhecido por codificar uma bomba de efluxo (Du *et al.*, 2004). O gene já foi documentado em diversas espécies bacterianas, tais como *Edwardsiella ictaluri* (Welch *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (Du *et al.*, 2004) e *Salmonella* spp. (Doublet *et al.*, 2004), conferindo resistência específica ao florfenicol.

Os sistemas de efluxo desempenham um papel crucial na proteção celular contra antimicrobianos, transportando ativamente os compostos para fora do citoplasma e/ou periplasma, reduzindo seu acúmulo em locais onde exercem sua ação. Esses achados sugerem uma relação entre a presença do gene *floR* e a resistência ao florfenicol, junto com a capacidade das bactérias de formar biofilme, possivelmente impulsionada pelo papel dos sistemas de efluxo na proteção contra antimicrobianos (Lynch, 2006).

A resposta bacteriana ao estresse, incluindo a exposição a antimicrobianos, é crucial para a persistência e adaptação. As bactérias podem ativar sistemas de reparo do DNA para corrigir danos genéticos causados pelo antibiótico, ajustar seu metabolismo para otimizar a produção de energia e nutrientes, aumentar a expressão de genes de resistência para neutralizar o antibiótico e regular a divisão celular para maximizar as chances de persistir no ambiente hostil (Fisher *et al.*, 2017; Harms *et al.*, 2016). Em *P. aeruginosa*, a estratégia mais comum para adquirir resistência adaptativa aos antimicrobianos é através da formação de biofilmes (Cohen *et al.*, 2013; Maurice *et al.*, 2018). Acredita-se que fatores como a composição do lipopolissacarídeo (LPS), proteínas da membrana externa e citoplasmática, composição de ácidos graxos, conteúdo e carga da membrana citoplasmática, bem como a hidrofobicidade e efluxo ativo de agentes, desempenhem papéis significativos nesse cenário de resistência bacteriana (Braoudaki; Hilton, 2005; Levin; Rozen, 2006)

Quanto à relação entre a DQO e a formação dos biofilmes, destaca-se que na ausência e na concentração 0,24 mg/mL de sulfametoxazol+trimetoprima para JVD05, foram observados níveis significativos de resistência, especialmente em concentrações

mais elevadas, como 2.000 e 20.000 mg/L. Da mesma forma, na concentração de 0,30 mg/mL de florfenicol e ausência de sulfametoxazol+trimetoprima, notou-se uma resistência em comparação com a concentração de 20.000 mg/L. No entanto, em concentrações menores, 2.000 e 400 mg/mL, tais resistências não foram observadas. Foi constatado que baixo nível de DQO, especificamente 400, não contribuiu com a resistência, mesmo porque esta DQO é encontrada em águas naturais, livres de poluição. Um reservatório com alta DQO propicia a colonização por biofilme devido à abundância de matéria orgânica, que serve como uma fonte nutritiva para os microrganismos presentes no ambiente, estimulando seu crescimento e multiplicação. Em resposta à disponibilidade de nutrientes, esses microrganismos frequentemente aumentam a produção de polissacarídeos extracelulares, os quais desempenham um papel crucial na formação da matriz do biofilme e na adesão das células bacterianas. Adicionalmente, o biofilme oferece proteção contra condições adversas, incluindo variações de temperatura, pH e concentrações de nutrientes, revelando-se particularmente vantajoso em ambientes com altas cargas orgânicas. Por fim, a presença de matéria orgânica pode tornar as superfícies mais atrativas para a adesão bacteriana, facilitando assim a formação inicial do biofilme (Raffo; Ruiz, 2014; WEF, 2000).

6.5. Avaliação da motilidade

Observam-se em *P. aeruginosa* diferentes tipos de movimentos. Isso inclui a movimentação natatória impulsionada pelo flagelo, além dos movimentos de enxame e contração na superfície, os quais são principalmente controlados pela hiperflagelação e pelos *pili* tipo IV, respectivamente (O'May; Tufenkji, 2011).

Os resultados evidenciam uma marcada redução na motilidade bacteriana em decorrência da exposição a antimicrobianos, como o florfenicol e a combinação de sulfametoxazol/trimetoprima. O florfenicol exerceu uma inibição significativa da motilidade em todas as linhagens testadas, resultando em reduções expressivas na velocidade da corrida em todas as formas de movimento bacteriano, incluindo natação, enxameação e espasmos. Da mesma forma, a associação de sulfametoxazol+trimetoprima também demonstrou uma redução notável na motilidade bacteriana, embora em uma escala ligeiramente inferior quando comparada ao florfenicol. A motilidade desempenha um papel crucial na colonização, na expressão total de virulência e na formação de biofilme da *P. aeruginosa*, sendo fundamental para sua

patogênese (Hu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). A exposição aos antimicrobianos afetou significativamente as motilidades de enxame, contração e natação, sugerindo que esses compostos podem interferir nas funções dos flagelos e *pili* tipo IV. Como a motilidade da *P. aeruginosa* é regulada pelo sistema *quorum sensing* (QS), (Glessner *et al.*, 1999) é possível que os antimicrobianos inibam essa motilidade interferindo com o QS ou agindo diretamente sobre os flagelos e *pili* tipo IV. Isso contribui parcialmente para a inibição da adesão, dispersão do biofilme e redução da expressão de outros fatores de virulência (Luo *et al.*, 2017).

Em relação aos resultados obtidos, onde as linhagens apresentaram uma redução na motilidade, especialmente quando expostas ao florfenicol, isso sugere uma correlação direta entre a exposição ao antibiótico e a diminuição na capacidade de movimento das bactérias. Essa redução na motilidade pode ter contribuído para uma adesão mais estável das células bacterianas às superfícies de cultura, promovendo assim a formação de biofilmes mais coesos e densamente estruturados. A partir desses resultados, é possível inferir que o florfenicol, ao inibir a motilidade bacteriana, pode ter favorecido a formação de biofilmes mais robustos, o que tem implicações importantes na resistência e persistência das infecções bacterianas. Essa relação entre a redução da motilidade e a formação de biofilme é crucial para compreender os mecanismos subjacentes à resistência bacteriana e para desenvolver estratégias eficazes de combate a biofilmes indesejados (Morgenstein; Rather, 2012; O'May; Tufenkji, 2011).

Ahmed *et al.* (2020), estudando as trajetórias evolutivas de *P. aeruginosa* em biofilme e modos de crescimento planctônico expostos à ciprofloxacina, relataram que não houve diferença significativa na motilidade *swimming* entre os isolados ciprofloxacina e o controle. Entretanto, observaram que os isolados resistentes a ciprofloxacina em ambos os grupos apresentaram uma diminuição na motilidade *swimming* em comparação com as colônias ancestrais. Notavelmente, as colônias resistentes a ciprofloxacina de populações evoluídas com controle exibiram uma motilidade *swarming* significativamente menor e uma motilidade *twitching* significativamente maior em comparação com populações evoluídas com ciprofloxacina.

7. CONCLUSÃO

Verificou-se a variação fenotípica nos seis isolados de *Pseudomonas aeruginosa* expostas a antimicrobianos de uso veterinário. Todos os isolados foram produtores de piocianina, com destaque para JVD05, de origem hospitalar. Além disso, em todos os isolados detectou-se forte hidrofobicidade da parede celular. Metade deles demonstraram resistência a três ou mais dos antimicrobianos, indicativo de multirresistência, incluindo nos isolados selvagens. Concentrações elevadas de florfenicol resultaram em um aumento significativo na adesão dos isolados, por outro lado, observou-se uma supressão substancial da adesão bacteriana quando os isolados foram expostos a concentrações mais elevadas de sulfametoxazol/trimetoprima. A exposição aos antimicrobianos levou a uma diminuição nos três tipos de motilidade exercidos por *P. aeruginosa*: natação (*swimming*), enxameamento (*swarming*) e tremulação (*twitching*). Já o florfenicol permitiu que as células se aderissem à superfície de maneira forte adesão, nas condições com maior DQO. Pode-se considerar como direcionamento para aprofundar esses achados, a exploração dos mecanismos subjacentes à resistência antimicrobiana e à virulência em *P. aeruginosa* exposta a antimicrobianos de uso veterinário. Isso pode envolver estudos moleculares para identificar genes de resistência e fatores de virulência. Além disso, há a possibilidade de investigar a eficácia de novos antimicrobianos ou combinações terapêuticas contra linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa*, utilizando testes *in vitro* e em modelos animais para avaliar a eficácia e a segurança dos novos tratamentos.

Outra área de pesquisa potencial é o desenvolvimento de estratégias para prevenir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em ambientes com alta carga de matéria orgânica, como águas residuárias. Isso pode incluir o desenvolvimento de agentes antimicrobianos específicos para combater biofilmes ou o uso de tecnologias de tratamento de água mais eficazes. Além disso, é importante avaliar o impacto da disseminação de linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa* no meio ambiente e na saúde pública, especialmente em ambientes onde há uso extensivo de antimicrobianos de uso veterinário. Por fim, desenvolver e avaliar estratégias de controle de infecção para prevenir a disseminação de *P. aeruginosa* multirresistente em ambientes hospitalares e veterinários é uma área de pesquisa crucial, envolvendo medidas de higiene, protocolos de isolamento e monitoramento de infecções.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; BONTEN, M.; KOOPMANS, M. Pandemics–One Health preparedness for the next. **The Lancet Regional Health–Europe**, v. 9, 2021. doi: 10.1016/j.lanpe.2021.100210.
- ABADI, A.T.B; RIZVANOV, A.A.; HAETLÉ, T.; et al. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, p. 778-788, 2019, doi: 10.1007/s12668-019-00658-4.
- ABDELAZIZ, A.A.; Kramer, A.M.A.; Al-Madboly, L.A.; et al. *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 110, 2023.
- ABDULL-HUSSEIN, Z.R.; ATIA, S.S. Antimicrobial effect of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Experimental Biology**. v. 6, . 6, p. 1–4, 2016.
- ABU, E.A.; SU, S.; SALLANS, L.; et al. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology**, v. 159, n. 8, p. 1736-1747, 2013.
- AHMAD, N.; JOJI, R.M.; SHAHID, M. Evolution and implementation of *One Health* to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1065796, 2023, doi: 10.3389/fcimb.2022.1065796.
- AHMED, M.N.; ABDELSAMAD, A.; WASSERMAN, T.; et al. The evolutionary trajectories of *P. aeruginosa* in biofilm and planktonic growth modes exposed to ciprofloxacin: beyond selection of antibiotic resistance. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 28, 2020.
- AL BAYSSARI, C.; DABBOUSSI, F.; HAMZE, M.; ROLAIN, J.M. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 950–951, 2015.
- ALLESEN-HOLM, M.; BARKEN, K.B.; YANG, L.; KLAUSEN, M.; WEBB, J.S.; KJELLEBERG, S.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1114–1128, 2006.
- AMBREETHA, S.; SINGH, V. Genetic and environmental determinants of surface adaptations in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 169, n. 6, p. 001335, 2023, DOI: 10.1099/mic.0.001335.
- AMUASI, J.H.; WINKLER, A.S. One health or planetary health for pandemic prevention? **The Lancet**, v. 396, n. 10266, p. 1882-1883, 2020.
- ANH, H.Q.; LE, T.P.Q.; LE, N.D.; et al. Antibiotics in surface water of East and Southeast Asian countries: A focused review on contamination status, pollution sources, potential risks, and future perspectives. **The Science of The Total Environment**, v. 764, p. 142865, 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142865.

ANSARI, S.; GHATAK, S.B.; PATEL, K.R.; et al. Antibiotic susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine samples. **Journal of Nepal Health Research Council**, v. 14, n. 32 50-54, 2016.

APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.

ASLAM, B.; KHURSHID, M.; ARSHAD, M.I.; et al. Antibiotic resistance: *one health* one world outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 1153, 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.771510.

AWAD, Y.M.; KIM, S-C.; EL-AZEEM, S.A.M.A.; et al. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. **Environmental Earth Sciences**. v. 71, 1433–1440, 2014.

BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 21-28, 2017.

BALABAN, N.Q.; MERRIN, J.; CHAIT, R.; et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1622-1625, 2004.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J-L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008.

BARTLETT, J.G.; GILBERT, D.N.; SPELLBERG, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 10, p. 1445-1450, 2013.

BATISTA, A.H.M.; MOREIRA, A.C.D.; CARVALHO, R.M.; et al. Antimicrobial effects of violacein against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1534, 2017, doi: 10.3390/molecules22101534.

BELENKY, P.; YE, J.D.; PORTER, C.B.; et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. **Cell Reports**. v. 13, n. 5, p. 968–980, 2015, Doi:10.1016/j.celrep.2015.09.059.

BILLINGS, N.; MILLAN, M.; CALDARA, M.; et al. The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. e1003526, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003526.

BOJARSKI, B.; KOT, B.; WITESKA, M. Antibacterials in aquatic environment and their toxicity to fish. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 8, p. 189, 2020, doi:10.3390/ph13080189.

BOLTON, L.F.; KELLEY, L.C.; LEE, M.D.; FEDORKA-CRAY, P.J.; MAURER, J.J. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1348–1351, 1999.

BORLEE, B.R.; GOLDMAN, A.D.; MURAKAMI, K.; SAMUDRALA, R.; WOZNIAK, D.J.; PARSEK, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 827–842, 2010.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H.J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 311–315, 2000.

BOXXAL, A. B. A. et al. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 287-294, 2003.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 73-78, 2004.

BREIDENSTEIN, E.B.M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.

BROGAN, D.M.; MOSSIALOS, E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. **Globalization and Health**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2016, doi: 10.1186/s12992-016-0147-y.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2003). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Thirteenth informational supplement (M100-S13). CLSI.

CABELLO, F.C., GODFREY, H.P.; TOMOVA, A.; et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 1917–1942, 2013, doi:10.1111/1462-2920.12134.

CANESCHI, A.; BARDHI, A.; BARBAROSSA, A.; et al. The use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine, a complex phenomenon: a narrative review. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 487, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12030487.

CANTON, L.; LANUSSE, C.; MORENO, L. Rational pharmacotherapy in infectious diseases: Issues related to drug residues in edible animal tissues. **Animals**, v. 11, n. 10, p. 2878, 2021, doi: 10.3390/ani11102878.

CARRASCHI, S.P.; SHIOGIRI, N.S.; VENTURINI, F.P.; et al. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 2, p. 115-122, 2011.

CASTAÑEDA-TAMEZ, P.; RAMÍRIZ-PERIS, J.; PÉREZ-VELÁSQUEZ, J.; et al. Pyocyanin restricts social cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1348. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01348.

CHANG, C.C.; MERRITT, K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 12, n. 4, p. 526-531, 1994.

CHARLTON, T.S. A repeatable biofilm removal assay and its application in the assessment of commercial cleaning formulations for medical devices. **Healthcare Infection**, v. 13, n. 4, p. 131-135, 2008.

CHEN, M.; OHMAN, K.; METCALFE, C.; et al. Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. **Water Quality Research Journal**, v. 41, n. 4, p. 351-364, 2006.

- CHEN, Y.; ZHOU, L.; YU, Q.; et al. Effects of sulfamethoxazole and florfenicol on growth, antioxidant capacity, immune responses and intestinal microbiota in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 575, 2023, doi: 10.3390/antibiotics12030575.
- CHENG, J.; JIANG, L.; SUN, T.; et al. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in the surface water of North China. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 77, p. 88–97, 2019.
- CHUNG, M-C.; DEAN, S.; MARAKASOVA, E.S.; et al. Chitinases are negative regulators of *Francisella novicida* biofilms. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e93119, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0093119.
- CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 913, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00913.
- COHEN, N.R.; LOBRITZ, M.A.; COLLINS, J.J. Persistência microbiana e o caminho para a resistência aos medicamentos. **Célula Hospedeira e Micróbio**, v. 13, n. 6, p. 632-642, 2013.
- COLLIN, L.B.; SILVA, J.P.M.; DELGADO, G.B.; VASCONCELLOS, F.A.; FÉLIX, S.R.; DUVAL, E.H. Evaluation of the biofilm formation by strains of Salmonella spp. Isolated from fresh sausage. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n. 8, p. 54428–54435, 2020.
- CORDEIRO, A.G.; PERALTA-ZAMORA, P. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprimapor espectroscopia eletrônica multivariada. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 254-260, 2008.
- CORRÊA, G.S.S.; GOMES, A.V.C.; CORRÊA, A.B.; et al. Effect of antibiotic and probiotic on the performance and carcass byield of boilers. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, 2003, doi: 10.1590/S0102-09352003000400013.
- COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K.J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 299-324, 1981.
- COX, C.D. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 1, p. 263-270, 1986.
- CUI, C., HU, X.; YIN, D.; et al. Occurrence, distribution, and seasonal variation of antibiotics in an artificial water source reservoir in the Yangtze River delta, East China. **Environmental Science Pollution Research**. v. 25, p. 19393–19402, 2018.
- DAS, T.; MANEFIELD, M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. E46718, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046718.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.
- DEGI, J.; CRISTINA, R.T.; STANCU, A. Otitis externa caused by bacteria of the genus *Pseudomonas* in dogs. **Lucrări**, v. 43, p. 143–147, 2010.

- DENG, Y., MAO, Y., LI, B., YANG, C., & ZHANG, T. Aerobic degradation of sulfadiazine by *Arthrobacter* spp.: kinetics, pathways, and genomic characterization. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 9566–9575, 2016.
- DEVNATH, P.; UDDIN, K.; AHMED, F.; et al. Extraction, purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2017.
- DI CESARE, A.; LUNA, G.M.; VIGNAROLI, C.; et al. Aquaculture can promote the presence and spread of antibiotic-resistant Enterococci in marine sediments. **PLoS One** 8, v. 8, n. 4, p. e62838, 2013, 10.1371/journal.pone.0062838.
- DIGGLE, S.P.; CORNELIS, P.; WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2, p. 83–91, 2006, doi: 10.1016/j.ijmm.2006.01.038. DIGGLE, S.P.; WHITELEY, M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 30-33, 2020.
- DONG, D.; ZHANG, L.; LIU, S.; et al. Antibiotics in water and sediments from Liao River in Jilin Province, China: occurrence, distribution, and risk assessment. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, p. 1-10, 2016, doi: 10.1007/s12665-016-6008-4.
- DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881-890, 2002.
- DOUBLET, B.; CARATTOLI, A.; WHICHARD, J.M.; et al. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the floR and bla CMY-2 genes in *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium* and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 2, p. 301-305, 2004.
- DOUSTDAR, F.; KARIMI, F.; ABEDINYFAR, Z.; et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with eye infections referred to Farabi Hospital, Tehran, Iran. **International Ophthalmology**, v. 39, p. 1581-1587, 2019.
- DU, X.; XIA, C.; SHEN, J.; et al. Characterization of florfenicol resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 183-189, 2004.
- DUEHOLM MS, SONDERGAARD MT, NILSSON M, CHRISTIANSEN G, STENSBALLE A, OVERGAARD MT, GIVSKOV M, TOLKER-NIELSEN T, OTZEN DE, NIELSEN PH. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. **Microbiologyopen**, v. 2, n. 3, p. 365-382, 2013, doi: 10.1002/mbo3.81.
- DUTT, Y.; DIHMAN, R.; SINGH, T.; et al. The association between biofilm formation and antimicrobial resistance with possible ingenious bio-remedial approaches. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 930, 2022, doi: 10.3390/antibiotics11070930.
- EI SOLH, A.A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 229–238, 2009, doi: 10.1093/jac/dkp201.

EVANS, C.R.; KEMPES, C.P.; PRICE-WHELAN, A.; et al. Metabolic heterogeneity and cross-feeding in bacterial multicellular systems. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 9, p. 732-743, 2020, doi: 10.1016/j.tim.2020.03.008.

EZE, E.A.; MUSTAPHA, K.J.; NDUBUISI, I.A.; et al. Studies on drug resistance among *Klebsiella* and *Citrobacter* spp isolated from two human groups and wild animals. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 11, n. 1, p. e58784, 2018, doi: 10.5812/jjm.58784.

FERGUSON, D.; CAHILL, O.J.; QUILTY, B. Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from two Irish hospitals. **Journal of Medical Biology**. v. 1, p. 1–15, 2017.

FILLOUX, A.; VALLET, I. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. **Médecine Sciences**, v. 19, n. 1, p. 77-83, 2003.

FISCH, K.; WANIEK, J.J.; ZHOU, M.; et al. Antibiotics in three Chinese coastal systems: Huangpu River, East China Sea, Pearl River Estuary. **J. Aquat. Pollut. Toxicol.** v. 1, n. 2, p. 13, 2017.

FISHER, R.A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453-464, 2017.

FLEMMING, H-C. Microbial biofouling: unsolved problems, insufficient approaches, and possible solutions. In: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., (org.). **Biofilm highlights**, Berlin - Alemanha : Springer, p. 81-109, 2011.

FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 623–633, 2010.

GALE, M.J.; MARINATO, M.S.; CHEN, Y-L.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* causing inflammatory mass of the nasopharynx in an immunocompromised HIV infected patient: A mimic of malignancy. **IDCases**, v. 2, n. 2, p. 40-43, 2015.

GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GHAFOOR, A.; HAY, I.D.; REHM, B.H.A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5238-5246, 2011.

GILLINGS, M.R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 4, 2013, doi: 10.3389/fmicb.2013.00004.

GLESSNER, A.; SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B.H.; et al. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 5, p. 1623-1629, 1999.

GILTNER, C.L.; VAN SCHAİK, E.J.; AUDETTE, G.F.; KAO, D.; HODGES, R.S.; HASSETT, D.J.; IRVIN, R.T. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. **Molecular Microbiology**, v.59, n. 4, p. 1083–1096, 2006.

GOMILA, A.; CARRATALÀ, J.; BADÍA, J.M.; et al. Preoperative oral antibiotic prophylaxis reduces *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after elective colorectal surgery: a multicenter prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018, 10.1186/s12879-018-3413-1.

GONÇALVES, T.; VASCONCELOS, U. Colour me blue: the history and the biotechnological potential of pyocyanin. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 927, 2021, doi: 10.3390/molecules26040927.

GUO, A.; ZHOU, Q.; BAO, Y.; et al. Prochloraz alone or in combination with nano-CuO promotes the conjugative transfer of antibiotic resistance genes between *Escherichia coli* in pure water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127761, 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127761.

GUZMAN-SOTO, I.; McTIERMAN, C.; GONZALES-GOMEZ, M.; et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. **iScience**, v. 24, n. 5, 2021, doi: 10.1016/j.isci.2021.102443.

HAJJARTABAR, M. Poor-quality water in swimming pools associated with a substantial risk of otitis externa due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 63-67, 2004.

HANNA, N.; SUN, P.; SUN, Q.; et al. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: its potential for resistance development and ecological and human risk. **Environment International**, v. 114, p. 131-142, 2018, doi: 10.1016/j.envint.2018.02.003.

HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science**, v. 354, n. 6318, 2016, doi: 10.1126/science.aaf4268.

HASSAN, H.M.; FRIDOVICH, I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. **Journal of Bacteriology**, v. 141, n. 1, p. 156-163, 1980.

HASSAN, Y.I.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K.; et al. Innovative drugs, chemicals, and enzymes within the animal production chain. **Veterinary Research**, v. 49, p. 1-17, 2018.

HÄUSSLER, S.; PARSEK, M.R. Biofilms 2009: new perspectives at the heart of surface-associated microbial communities. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 2941-2949, 2010.

HE, S.; DONG, D.; ZHANG, X.; et al. Occurrence and ecological risk assessment of 22 emerging contaminants in the Jilin Songhua River (Northeast China). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 24003-24012, 2018, doi: 10.1007/s11356-018-2459-3.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5-17, 2002.

HICKMAN, J.W.; TIFREA, D.F.; HARWOOD, C.S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 40, p. 14422–14427, 2005.

HOIBY, N.; JACOBSEN, L.; JORGENSEN, B.A.; LYKKEGAARD, E.; WEEKE, B. Infecção de *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística: Ocorrência de anticorpos precipitantes contra *Pseudomonas aeruginosa* em relação à concentração de dezesseis proteínas séricas e o estado clínico e radiográfico dos pulmões. **Acta Pediátrica**, v. 63, p. 843–848, 1974, doi:10.1111/j.1651-2227.1974.tb04874.

HIGUERA-LLANTÉN, S.; VÁSQUEZ-PONCE, F.; BARRIENTOS-ESPIZO, B.; et al. Extended antibiotic treatment in salmon farms select multiresistant gut bacteria with a high prevalence of antibiotic resistance genes. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0203641, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0203641

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Reviews of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**. v. 10, n. 4, p. 441–451, 2010.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOLMSTROM, K., GRÄSLUND, S.; WAHLSTRÖM, A.; et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 38, n. 3, p. 255–266, 2023, doi: 10.1046/j.1365-2621.2003.00671.x.

HU, H.; HARMER, C.; ANUJ, S.; WAINWRIGHT, C.E.; MANOS, J.; CHENEY, J.; HARBOUR, C.; ZABLOTSKA, I.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.B.; GRIMWOOD, K.; ROSE, B. Type 3 secretion system effector genotype and secretion phenotype of longitudinally collected *Pseudomonas aeruginosa* isolates from young children diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 3, p. 266–272, 2013, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03770.x

JACKSON, K.D.; STARKLEY, M.; KREMER, S.; et al. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4466 - 4475, 2004.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1159-1168, 2014.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.M.; GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 363-380, 2009.

KHAN, G.A.; BERGLUND, B.; KHAN, K.M.; et al. Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities—a study in Pakistan. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e62712, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062712.

KHAN, N.H.; ISHII, Y.; KIMATA-KINO, N.; et al. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 2, p. 173–186, 2007, doi: 10.1007/s00248-006-9059-3.

KIM, J.; AHN, J. Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. **Food Science and Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 1481-1499, 2022.

KIM, J-W.; HONG, Y-K.; YANG, J-E.; et al. Bioaccumulation and mass balance analysis of veterinary antibiotics in an agricultural environment. **Toxics**, v. 10, n. 5, p. 213, 2022, doi: 10.3390/toxics10050213.

KIM, S-K.; LEE, J-H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, p. 71-85, 2016.

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; et al. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 61-68, 2003, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x.

KOSMA, C.I.; LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and environmental risk assessment. **The Science of the Total Environment**, v. 466, p. 421-438, 2014.

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 112, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00112.

KURACHI, M. Studies on the biosynthesis of pyocyanine (I): On the cultural condition for pyocyanine formation. **Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University**, v. 36, n. 6, p. 163-173, 1958.

LABORDA, P.; SANS-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; et al. *Pseudomonas aeruginosa*: An antibiotic resilient pathogen with environmental origin. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 125-132, 2021, doi: 10.1016/j.mib.2021.09.010.

LAWRENCE, J.R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, 1991, doi: 10.1128/jb.173.20.6558-6567.1991.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; et al. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 2-3, p. 153-158, 1999, doi: 10.1016/s0168-1605(99)00151-8.

LEVIN, B.R.; ROZEN, D.E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 556-562, 2006.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2007.

LIAO, C.; HUANG, X.; WANG, Q.; YAO, D.; LU, W. Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v, 12, p. 926758, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.926758

LI, J.; SHAO, B.; SHEN, J.; et al. Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 2892-2897, 2013, doi: 10.1024/es304616c.

LI, W.C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193-201, 2014.

LIM, S-K.; KIM, D.; MOON, D-C.; et al. Antibiotic resistomes discovered in the gut microbiomes of Korean swine and cattle. **Gigascience**, v. 9, n. 5, p. giaa043, 2020, doi: 10.1093/gigascience/giaa043.

LITTLE, A.S.; OKKOTSU, Y.; REINHART, A.A.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation status differentially regulates pyocyanin and pyoverdine production. **MBio**, v. 9, n. 1, p. e02318-17, 2018, doi: 10.1128/mBio.02318-17.

LOOS, R.; CARVALHO, R.; ANTÓNIO, D.C.; et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. **Water research**, v. 47, n. 17, p. 6475-6487, 2013, doi: 10.1016/j.watres.2013.08.024.

LUO, J.; DONG, B.; WANG, K.; et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model. **PLoS One**, v. 12, n. 4, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0176883.

LYNCH, A.S. Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 949-956, 2006.

MA, H.T.; GAO, K.; TANG, Y.S.; et al. Analysis of pollution levels of 7 antibiotics in the Wenyu river water of Beiyun River water system in Beijing after the pollution control: A preliminary study. **Earth Environmental Science**. v.186, p. 012068, 2018, doi: 10.1088/1755-1315/186/3/012068.

MA, L.; CONOVER, M.; LU, H.; et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000354.

MAO, W.V. H.; XIE, Z.; CHEN, W.; TANG, S. Systematic review on irrational use of medicines in China and Vietnam. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0117710, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0117710.

MATSUKAWA, M.; GREENBERG, E.P. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4449–4456, 2004, doi: 10.1128/JB.186.14.4449-4456.2004

MAH, T-F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061-1072, 2012.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; et al. Antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish and poultry products. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 114-119, 2009.

MANGALAPPALLI-ILLATHU, A.K.; VIDOVIC, S.; KORBER, D.R. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3669-3680, 2008.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Proibições**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/legislacao/proibicoes-de-aditivos-na-alimentacaoanimal#:~:text=Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20SARC%2FMAPA%20n%C2%BA,em%20animais%20produtores%20de%20alimentos>>. Acesso em: 26 mar. 2024.

MARIOTINI, A.B.; CARVALHO, E.V. Perfil de Resistência aos Antimicrobianos de bactérias isoladas de infecções de animais atendidos no UNIFAA. **Revista Saber Digital**, v. 13, n. 1, p. 176-187, 2020.

MARREZ, D.A.; MOHAMAD, H.S. Biological activity and applications of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Open Access Journal of Biomedical Science**, v. 2, n. 1, p. OAJBS.ID.000133, 2020, doi: 10.38125/OAJBS000133.

MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J.L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36-41, 2014.

MARTINS, M.; DASTIDAR, S.G.; FANNING, S.; et al. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 3, p. 198-208, 2008.

MATHEE, K.; NARASIMHAN, G.; VALDES, C.; et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 8, p. 3100–3105, 2008, doi: 10.1073/pnas.0711982105.

MAURICE, N.M.; BEDI, B.; SADIKOT, R.T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 4, p. 428-439, 2018.

MAURODI, D.V.; BONSALE, R.F.; DELANEY, S.M.; et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001, doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001.

McEWEN, S.A.; COLLIGNON, P.J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiological Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 521-547, 2018, doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

MIRANI, Z.A.; FATIMA, A.; UROOJ, S.; et al. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 7, p. 760-769, 2018.

MISHRA, S.K.; ACHARYA, J.; KATTEL, H.P. Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine samples of urinary tract infection patients in tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. **Journal of Kathmandu Medical College**, v. 1, n. 3, p. 128-132, 2012.

MOAYEDI, A.; NOWROOZI, J.; SEPAHY, A.A. Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 20, 1331–1338, 2017.

MONTEIRO, S.H.; FRANCISCO, J.G.; CAMPION, T.F.; PIMPINATO, R.F.; MOURA ANDRADE, G.C.R.; GARCIA, F.; TORNISIELO, V.L. Multiresidue antimicrobial determination in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*) cage farming by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Aquaculture**, v. 447, p. 37-43, 2015.

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 39, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.

MORGENSTEIN, R.M.; RATHER, P.N. Role of the Umo proteins and the Rcs phosphorelay in the swarming motility of the wild type and an O-antigen (waaL) mutant of *Proteus mirabilis*. **Journal of Bacteriology**, v.194, n. 3, p. 669–676, 2012, doi: 10.1128/JB.06047-11.

MOUICHE, M.M.M.; MOFFO, F.; AKOACHERE, J-F.T.K.; et al. Antimicrobial resistance from a one health perspective in Cameroon: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 19, p. 1135, 2019, doi: 101186/s12889-019-7450-5.

MUAZ, K.; RIAZ, M.; AKHTAR, S.; et al. Antibiotic residues in chicken meat: global prevalence, threats, and decontamination strategies: a review. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 4, p. 619-627, 2018, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-086.

MULLER, M. Glutathione modulates the toxicity of, but is not a biologically relevant reductant for, the *Pseudomonas aeruginosa* redox toxin pyocyanin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 8, p. 971-977, 2011.

MUTUKU, C.; GAZDAG, Z.; MELEGH, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38 n. 9, p. 152, 2022, doi: 10.1007/s11274-022-03334-0.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. **15o Informational Supplement**. CLSI/ NCCLS document M100-515.

NORAMBUENA, L.; GRAS, N.; CONTRERAS, S. Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 154-160, 2013.

NOWROOZI, J.; SEPAHI, A.A.; RASHNONEJAD, A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 14, n. 1, p. 7, 2012.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. **OIE International Committee.**, v. 33, p. 1-9, 2015.

O'MAY, C.; TUFENKJI, N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 3061-3067, 2011.

ORAEZUKOR, C.; SULE, I.; TAMIZHAZHAGAN, V. Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical and Environmental Sources. **Indian Journal of Natural Sciences**. v.12, n. 69, p. 35583-35587, 2021.

ORLANDO, E.A.; ROQUE, A.G.C.; LOSEKANN, M.E.; et al. UPLC–MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle. **Journal of Chromatography B**, v. 2016, p. 1:1035:8-15, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.09.013.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.

OVERHAGE, J.; BAINS, M.; BRAZAS, M. D.; HANCOCK, R.E.W. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2671–2679, 2008.

PAMP, S.J.; TOLKER-NIELSEN, T. Múltiplas funções de biossurfactantes no desenvolvimento de biofilme estrutural por *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, 2007, doi: 10.1128/jb.01515-06.

PAPICH, M.G. **Manual Saunders de terapia veterinária**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.

PARK, S-Y.; PARK, H.J.; MOON, S.M.; et al. (2012). Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **BMC Infectious Diseases**. v. 12, p. 308, 2012, doi: 10.1186/1471-2334-12-308.

PERCIVAL, S.L.; et al. Introduction to biofilms. In: PERCIVAL, S.; KNOTTENBELT, D.; COCHRANE, C. (Eds.). **Biofilms and Veterinary Medicine**. Berlin/Heidelberg: Springer, 2011. p. 41–68.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 65, 2011, doi: 10.3389/fmicb.2011.00065.

POORTINGA, A.T; BOS, R.; BUSSCHER, H. Reversibilidade da adesão bacteriana na superfície do eletrodo. **Langmuir**. v. 17, n. 9, p. 2851–2856, 2001.

PRESCOTT, J.F. Sulfonamides, diaminopyrimidines, and their combinations. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; DOWLING, P.M. (Ed.) **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 5th ed., 2013, p. 279-294, doi: 10.1002/9781118675014.ch17.

QIAO, M.; YING, G-G.; SINGER, A.C.; et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**, v. 110, p. 160-172, 2018, doi: 10.1016/j.envint.2017.10.016.

QIN, S.; XIAO, W.; ZHOU, C.; et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 199, 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01056-1.

RAFFO LECCA, E.; RUIZ LIZAMA, E. Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno. **Datos Industriales**, v. 17, n. 1, p. 71–80, 2014.

RATTANAPANADDA, P.; KUO, H.C.; VICKROY, T.W.; SUNG, C.H.; RAIKAT, T.; LIN, T.L.; YEH, S.Y.; CHOU, C.C. In vitro and in vivo Synergistic Effects of Florfenicol and Thiamphenicol in Combination Against Swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2430, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02430.

RAFIEE, R.; EFTEKHAR, F.; TABATABAEI, S. A. Frequency of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in intensive care units in Tehran-Iran: emergence of antibiotic resistance. **Iranian Journal of Pathology**, v. 9, n. 4, p. 255-262, 2014.

RAHMAN, S.; HOLLIS, A. The effect of antibiotic usage on resistance in humans and food-producing animals: a longitudinal, *One Health* analysis using European data. **Frontiers in Public Health**, v. 15, n. 11, p. 1170426, 2023, doi: 10.3389/fpubh.2023.1170426.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 2015, p. 759348, 2015, doi: 10.1155/2015/759348.

REMOLD, S.K.; BROWN, C.K.; FARRIS, J.E.; et al. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 3, p. 505-517, 2011, doi 10.1007/s00248-011-9844-5.

REN, XIANYUN; WANG, ZHUQING; GAO, BAOQUAN; LIU, PING; LI, JIAN. Effects of florfenicol on the antioxidant status, detoxification system and biomolecule damage in the swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 6-11, 2017, doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.05.003.

REYES-LARA, S.; REYES-MAZZOCO, R. Efeito das cargas hidráulicas e orgânicas sobre a remoção de massa de uma embalagem estruturada em um filtro percolador. **Revista Ingeniería Química**, v. 1, p. 101–109, 2009.

RIBEIRO, R. C. N.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. **Utilização racional de antimicrobianos na clínica veterinária**. 2018. Disponível em: <<http://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/127>>. Acesso em: 26 nov. 2023.

ROBINSON, R.W.; AKIN, D.E.; NORDSTEDT, R.A.; et al. Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 127-136, 1984, doi: 10.1128/aem.48.1.127-136.1984.

ROSENTHAL, V.D.; BAT-ERDERE, I.; GUPTA, D.; et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 45 countries for 2012-2017: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 48, n. 4, p. 423-432, 2020, doi: 10.1016/j.ajic.2019.08.023.

ROSSI, C.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; et al. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control**, v. 86, n. 4, p. 241-248, 2018, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.018.

ROUSHAM, E.K.; UNICOMB, L.; ISLAM, M.A. Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1876, p. 20180332, 2018, doi:10.1098/rspb.2018.0332.

RUMBAUGH, K.P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.

SALEEM, H.; MAZHAR, S.; SYED, Q.; JAVED, M.Q.; ADNAN, A. (2021). Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic *Pseudomonas* species found in Pakistani native flora. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 103005, 2021, doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103005.

SÁ-CORREIA, I.; ALLYDICE-FRANCIS, K.; BROWN, P.D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 426241, 2012, doi: 10.1155/2012/426241.

SANTOS, L.H.M.L.M.; GROS, M.; RODRIGUEZ-MOROZAZ, S.; et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461, p. 302-316, 2013, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.

SCHEUERMAN, P.R.; SCHMIDT, J.P.; ALEXANDER, M. Factors affecting the survival and growth of bacteria introduced into lake water. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 320-325, 1988.

SHROUT, J.D.; CHOPP, D.L.; JUST, C.L; et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1264-1277, 2006, doi: 10.1111/j.1365-258.2006.05421.x.

SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 151-169, 2008.

SINGER, A.C.; SHAW, H.; RHODES, V.; et al. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1728, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01728.

SINGH, P.K.; SCHAEFER, A.L.; PARSEK, M.R.; et al. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 762-764, 2000, doi: 10.1038/35037627.

SISMAET, H.J.; WEBSTER, T.A.; GOLUCH, E.D. Up-regulating pyocyanin production by amino acid addition for early electrochemical identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Analyst**, v. 139, n. 17, p. 4241-4246, 2014.

SILVA, N.C.S.L.; NOGUEIRA, J.F.; GOUVEIA, J.J.S.; COSTA, M. M.; GOUVEIA, G.V. Gene floR e a resistência ao florfenicol em isolados de *Aeromonas* spp. autóctones de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 357-366, 2018, doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4842.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, n. 9, p. 1133-1148, 2009, doi:10.1099/jmm.0.009142-0.

STOODLEY, P.; DEBEER, D.; LEWANDOWSKI, Z. Liquid flow in biofilm systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2711-2716, 1994.

STREMPEL, N.; NEIDIG, A.; NUSSER, M.; et al. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82240, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0082240.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

TANG, K.L.; CAFFREY, N.P.; NÓBREGA, D.B.; et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. e316-e327, 2017, doi: 10.1016/S2542-5196(17)30141-9.

TUON, F.F.; DANTAS, L.R.; SUSS, P.H.; et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 300, 2022, doi: 10.3390/pathogens11030300.

TURNBULL, L.; TOYOFUKO, M.; HYNEN, A.L.; et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. **Nature Communications**. v. 7, p. 11220, 2016, doi: 10.1038/ncomms11220.

TYFA, A.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; ZABIELSKA, J. Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. **Acta Biochimica Polonica**. v. 62, n. 4, p. 785-790, 2015.

- VARELA, M.F. et al. Bacterial resistance to antimicrobial agents. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 593, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10050593.
- VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review. **Sci Total Environ**, v. 1, n. 429, p. 123-155, 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028.
- VETRIVEL, A.; RAMASAMY, M.; VETRIVEL, P.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. **Biologics**, v. 1, n. 3, p. 312-336, 2021, doi: 10.3390/biologics1030019.
- VIANA, A.A.G.; MARTINS, R.X.; FERREIRA, G.F.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin negatively act on the establishment of Enterobacteriaceae biofilm on a ceramic surface. **International Journal of Engineering Research and Application**, v. 7, n. 8, p. 23-30, 2017.
- VIJ, R.; DANCHIK, C.; CRAWFORD, C.; et al. Variation in cell surface hydrophobicity among *Cryptococcus neoformans* strains influences interactions with amoebas. **MSphere**, v. 5, n. 10, p. 1128, 2020, doi: 10.1128/msphere.00310-20.
- VON WINTERSDORFF, C.J.H.; PENDERSJ.; VAN NIEKERK, J.M.; et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 173, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.
- VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R.J.; et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009, doi: 10.3390/molecules14072535.
- WANG, C.; DONG, D.; ZHANG, L.; et al. Response of freshwater biofilms to antibiotic florfenicol and ofloxacin stress: role of extracellular polymeric substances. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 5, p. 715, 2019.
- WANG, W.; WENG, Y.; LUO, T.; et al. Antimicrobial and the resistances in the environment: ecological and health risks, influencing factors, and mitigation strategies. **Toxics**, v. 11, n. 2, p. 185, 2023, doi: 10.3390/toxics1120185.
- WANG, Y.; ENGELSTÄDTER, J.; ZHANG, S.; et al. Non-antibiotic pharmaceuticals enhance the transmission of exogenous antibiotic resistance genes through bacterial transformation. **The ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 2179-2196, 2020, doi: 10.1038/s41396-020-0679-2.
- WARBURTON, W.D; BOWEN, B; KONKLE, A. A sobrevivência e recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* e seu efeito sobre as salmonelas na água: metodologia para testar água engarrafada no Canadá. **Jornal Canadense de Microbiologia**, v. 40, n. 12, p. 987-992, 1994, doi: 10.1139/m94-158.

WEBB, J.S.; LAU, M.; KJELLEBERG, S. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **J Bacteriol.** v. 186, n. 23, p. 8066-8073. doi: 10.1128/JB.186.23.8066-8073.2004.

WEF – WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Wastewater Treatment Fundamentals.** Water Environment Federation, 2000.

WELCH, T.J.; EVENHUIS, J.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; HARBOTTLE, H.; MILLER, R.A.; GRIFFIN, M.; WISE, D. IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 53, n. 2, p. 845-846, 2009, doi: 10.1128/AAC.01312-08.

WHITCHURCH C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C; MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science.** v. 22, n. 295(5559):1487, 2002, doi: 10.1126/science.295.5559.1487.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals: web annex A: evidence base.** World Health Organization, 2017.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019.** World Health Organization, 2019.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health,** v. 214, n. 6, p. 417-423, 2011.

WOOD, E.; SCHULENBURG, H.; ROSENSTIEL, P.; BERGMILLER, T.; ANKRETT, D.; GUDELJ, I.; BEARDMORE, R. Ribosome-binding antibiotics increase bacterial longevity and growth efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 120, n. 40, p. e2221507120, 2023. Doi:10.1073/pnas.2221507120

WU, M.; LI, X. Chapter 87-*Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. In: TANG, Y-W.; SUSSMAN, M.; LIU, D.; et al. (org.), **Molecular Medical Microbiology,** 2nd Ed., v. 3, Elsevier, Amsterdam, p. 1547-1564, 2015

YANG, W-C.; LIU, Z-Y.; et al. Florfenicol sustained-release granules: an in vitro-in vivo correlation study in pigs. **BMC Veterinary Research,** v. 19, n. 1, p. 81, 2023, doi: 10.1186/s12917-023-03631-2.

YIN, Y; PAPAVALIIOU, G.; ZABORINA, O.Y.; et al. *De novo* synthesis and functional analysis of polyphosphate-loaded poly (ethylene) glycol hydrogel nanoparticles targeting pyocyanin and pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa* as a model intestinal pathogen. **Annals of Biomedical Engineering,** v. 45, p. 1058-1068, 2017, doi: 10.1007/s10439-016-1740.

ZHANG, Q-Q.; YING, G-G.; PAN, C-G.; et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. **Environmental Science and Technology,** v. 49, n. 11, p. 6772-6782, 2015.

ZHAO, Z-G.; YAN, S-S.; YU, Y-M.; et al. An aqueous extract of Yunnan Baiyao inhibits the quorum-sensing-related virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology,** v. 51, p. 207-212, 2013, doi: 10.1007/s12275-013-2595-x.

ZHU, K.; CHEN, S.; SYSOEVA, T.A.; et al. Universal antibiotic tolerance arising from antibiotic-triggered accumulation of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Biology**, v. 17, n. 12, p. e3000573, 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.300057