

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA
FARMACÊUTICA

FERNANDA CRISTINA REZENDE AZEVEDO

**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS E PRODUÇÃO DE CIANOTOXINAS**

Belo Horizonte

2016

FERNANDA CRISTINA REZENDE AZEVEDO

**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS E PRODUÇÃO DE CIANOTOXINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Área de concentração: Medicamentos em populações

Orientador: Sérgia Maria Starling Magalhães

Belo Horizonte
2016

A994a Azevedo, Fernanda Cristina Rezende.
Atividade de antimicrobianos sobre o crescimento de cianobactérias e produção de cianotoxinas / Fernanda Cristina Rezende Azevedo. – 2016.
85 f. : il.

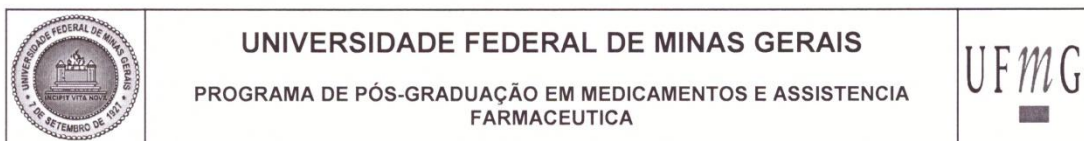
Orientador: Sérgia Maria Starling Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

1. Medicamentos – Contaminação – Teses. 2. Cianobactéria – Teses. 3. Toxinas cianobacterianas – Teses. 4. Microcistinas – Teses. 5. Ciprofloxacino – Teses. 6. Clorexidina – Teses. I. Magalhães, Sérgia Maria Starling. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.1

FOLHA DE APROVAÇÃO



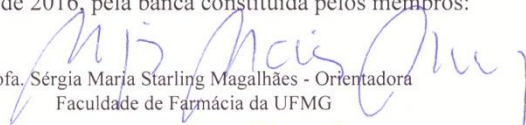
FOLHA DE APROVAÇÃO


**ATIVIDADE DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O CRESCIMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS E PRODUÇÃO DE CIANOTOXINAS**

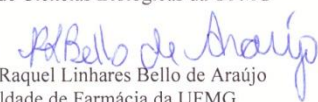
FERNANDA CRISTINA REZENDE AZEVEDO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICAMENTOS E ASSISTENCIA FARMACEUTICA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, área de concentração MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA.

Aprovada em 04 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). SÉrgia Maria Starling Magalhães - Orientadora
Faculdade de Farmácia da UFMG


Prof(a). Maione Wittig Franco
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG


Prof(a). Raquel Linhares Bello de Araújo
Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, 4 de agosto de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa

Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE FARMÁCIA

Diretor

Prof. Gerson Antônio Pianetti

Vice-Diretora

Profa. Leiliane André Amorin

Chefe do Departamento de Farmácia Social

Profa. Cristiane Aparecida Menezes de Pádua

Sub-Chefe do Departamento de Farmácia Social

Profa. Marina Lima Guimarães

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA

Coordenadora

Profa. Djenane Ramalho de Oliveira

Sub-Coordenador

Prof. Augusto Afonso Guerra Júnior

Colegiado do Programa

Profa. Djenane Ramalho de Oliveira

Profa. Cristina Mariano Ruas Brandão-

Prof. Francisco de Assis Acurcio

Profa. Juliana Alvares-

Profa. Maria das Graças Braga Ceccato

Prof. Augusto Afonso Guerra Júnior-

Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

Profa. Mariângela Leal Cherchiglia

Discente Michael Ruberson Ribeiro da Silva

Discente Jéssica Barreto R. dos Santos

Esse trabalho contou com a colaboração dos professores Francisco Barbosa, coordenador do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA, do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; e da professora Sandra M. F. O. Azevedo, coordenadora do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias – LETC, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho à minha família; pai, irmã e mãe, que nunca mediram esforços para me dar educação e apoio incondicional, em todos os momentos.

À profa. Sérgia Starling, pela oportunidade, acolhimento e confiança em minha capacidade. Essa experiência me proporcionou muitos ensinamentos que levarei por toda a vida profissional e pessoal. Além de orientadora neste trabalho é minha chefe direta no departamento de Farmácia Social, e sem o seu pronto apoio não teria conseguido realizar este sonho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica, que contribuíram muito para o meu aprendizado.

À equipe do laboratório de Análise de Água/UFMG: ao meu colega de trabalho Geraldo, pelo pronto apoio à realização deste sonho, e compreensão, mesmo que indiretamente, na rotina do trabalho. À Simone, colega de trabalho, pela compreensão às minhas ausências para realização de experimentos e disciplinas, e apoio no dia-a-dia. À Alice, colega de trabalho, pela compreensão às minhas ausências para realização de experimentos, apoio no dia-a-dia, e amizade, tornando a caminhada final mais leve. Às estagiárias que passaram pelo laboratório durante a realização desse trabalho, em especial à Jéssika, Ana Carolina e Raíssa, sempre dedicadas e prestativas.

À Sarah, colega de bancada, pelo apoio inicial, me ensinando tudo o que sabia sobre cianobactérias, o que me ajudou muito na realização dos experimentos.

À Carla, colega de bancada, pelo pronto apoio nos experimentos e amizade, tornando esta caminhada final mais leve.

A toda a equipe do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática - LIMNEA/ICB, em especial à Isabela, Raquel e Maione, pelo pronto apoio, receptividade e ensinamentos sobre biologia e ecologia, área que aprendi a gostar. Ao prof. Francisco Barbosa, pela receptividade, apoio e confiança.

À profa. Sandra M. F. O. Azevedo, coordenadora do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC), pelo acolhimento, apoio, disponibilidade e grande aprendizado. Aos técnicos Ricardo e Luciane, pelo apoio e disponibilidade.

Ao Marcell, companheiro da vida, pelo amor, apoio e compreensão a essa rotina corrida e muitas ausências.

Aos grandes amigos presentes na minha vida, aos “Rapaizes” pelas zoeiras gostosas, aos “Amadinhos da Micro”, pelas zoeiras e boas trocas de experiências, e às amigas de Lagoa, pela compreensão as minhas ausências e que direta ou indiretamente tornaram essa caminhada mais leve.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho constitui Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, linha de pesquisa em Medicamentos em Populações, para obtenção do grau de Mestre em Medicamentos e Assistência Farmacêutica. É apresentado em formato de Artigo Científico, conforme estabelecido no Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica, no seu Capítulo VI, Art. 59, Parágrafo 1º.

Este volume contém:

1. Considerações Iniciais: apresenta a fundamentação teórica, a partir de breve revisão da literatura e a justificativa da proposta;
2. Apresentação dos objetivos da dissertação.
3. Artigo I, intitulado “Efeitos toxicológicos de ciprofloxacino e clorexidina no crescimento e síntese de clorofila de microalgas de água doce”, é realizado a análise do efeito do antimicrobiano Ciprofloxacino e do biocida Clorexidina no crescimento de cianobactérias do gênero *Microcystis*, e determinado a concentração que inibe 50% do crescimento celular.
4. Artigo II, intitulado “Efeitos tóxicos de Ciprofloxacino e Clorexidina em linhagens de cianobactérias produtoras de toxinas”, é realizado a análise do efeito do antimicrobiano Ciprofloxacino e do biocida Clorexidina na produção e liberação de toxinas por cianobactérias do gênero *Microcystis*.
5. Considerações finais e conclusão: compreendem os aspectos críticos e relevantes do estudo, e recomendações.

RESUMO DA DISSERTAÇÃO

A contaminação do ambiente por medicamentos é uma preocupação crescente, principalmente se tratando de antimicrobianos e biocidas. Esses tipos de substâncias afetam diretamente a biota local devido a sua natureza terapêutica, e esperada estabilidade em meio orgânico. Dentre os mais intensamente utilizados, em meio hospitalar, doméstico e veterinário, temos o ciprofloxacino, antimicrobiano da classe das quinolonas, muito encontrado no meio aquático, e a clorexidina, biocida da classe das biguanidas, amplamente utilizado no meio hospitalar e odontológico. Dos microrganismos mais afetados pela presença dessas substâncias antimicrobianas, as cianobactérias são consideradas uma das mais sensíveis, além de serem as mais suscetíveis, por estarem distribuídas por todo o ambiente, dominando a produção bentônica e planctônica de diversos habitats. As cianobactérias conseguem se proliferar em ambientes fortemente impactados e, considerando o aquecimento global, podem ocorrer as florações. Esse fenômeno tem se tornado comum nas águas superficiais pelo mundo, e é preocupante devido à maior produção e liberação de metabólitos secundários pelas cianobactérias, dentre esses as cianotoxinas. Elas podem ser hepatotóxicas, neurotóxicas ou citotóxicas, sendo relatados diversos acidentes de envenenamento por animais e até mesmo pelo homem, em contato com corpos d'água contaminados. **Objetivos:** definir a EC_{50} de duas linhagens de cianobactérias do gênero *Microcystis* sob efeito de ciprofloxacino e de clorexidina. Analisar a produção e liberação de cianotoxinas produzidas por quatro linhagens de cianobactérias do gênero *Microcystis*, sob efeito de determinada concentração de ciprofloxacino e de clorexidina. **Métodos:** teste de inibição de crescimento (Protocolo OECD 201), utilizando a cepa de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*, individualmente, e o antimicrobiano ciprofloxacino e o biocida clorexidina, individualmente. Foram realizadas curvas de crescimento e a partir desses valores calculado a concentração de substância que inibe 50% do crescimento das células, em cultivo em laboratório. Posteriormente, quatro linhagens diferentes de cianobactérias do gênero *Microcystis* foram colocadas em contato com concentrações determinadas de ciprofloxacino e clorexidina, concentrações próximas da EC_{50} definida no experimento anterior, e após 96 horas foi extraída a microcistina intracelular e extracelular, sendo quantificadas por método imunoenzimático. **Resultados:** no primeiro experimento, duas das linhagens se mostraram mais sensíveis ao antimicrobiano do que ao biocida, sendo afetado também a produção de clorofila pelas células. No segundo experimento, três das quatro linhagens apresentaram aumento na concentração de microcistina, sob efeito de ciprofloxacino, e duas das quatro

linhagens apresentaram aumento na concentração de microcistina, sob efeito da clorexidina.

Conclusões: os resultados apontaram a gravidade do lançamento de efluentes contendo resíduos de medicamentos nos corpos d'água, oferecendo risco direto à biota aquática e indireto à população humana, com a liberação de metabólitos secundários nocivos pelas cianobactérias.

Palavras chave: cianobactérias, microcistina, ciprofloxacino, clorexidina, florações.

ABSTRACT

Contamination of the environment by drugs is a growing concern, especially when it comes to antimicrobials and biocides. These types of substances directly affect the local biota because of its therapeutic nature, and expected stability in organic medium. Among the most heavily used in hospital, household and veterinary means we have ciprofloxacin, a quinolone antimicrobial class, very found in the aquatic environment, and chlorhexidine, biocide of the biguanide class, widely used in hospital and dental environment. Among the micro-organisms most affected by the presence of these harmful substances, cyanobacteria are considered one of the most sensitive, and are the most susceptible because they are distributed throughout the environment, dominating the benthic and planktonic production of various habitats. Cyanobacteria can proliferate in strongly impacted environments and, considering global warming may occur blooms. This phenomenon has become common in surface waters throughout the world, and is worrying due to increased production and release of secondary metabolites by cyanobacteria, among these the cyanotoxins. They can be hepatotoxic, neurotoxic or cytotoxic, and reported several poisoning accidents by animals and even humans, contact with contaminated bodies of water. **Objectives:** To define the EC₅₀ two cyanobacterial strains of the genus *Microcystis* under the effect of ciprofloxacin and chlorhexidine. To analyze the production and release of cyanotoxins by four cyanobacterial strains of *Microcystis* genus, under the influence of certain concentration of ciprofloxacin and chlorhexidine. **Methods:** Growth inhibition test (OECD 201 protocol), using strains of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis panniformis* individually and ciprofloxacin antimicrobial and biocidal chlorhexidine individually. Growth curves were performed and were calculated values of these substance concentration that inhibits 50% of cell growth in culture in the laboratory. Subsequently, four different cyanobacterial strains of *Microcystis* genus were placed in contact with concentrations of ciprofloxacin and chlorhexidine, near the EC₅₀ set in the previous experiment, and after 96 hours was extracted intracellular and extracellular microcystin, being quantified by enzyme immunoassay. **Results:** In the first experiment, two of the strains were more sensitive to antimicrobial than the biocidal, also being affected the production of chlorophyll by the cells. In the second experiment, three of the four strains showed higher concentrations of microcystin under effect of ciprofloxacin, and two of the four strains showed higher concentrations of microcystin under effect of chlorhexidine. **Conclusions:** The results indicate the seriousness of the discharge of effluents

containing drug residues in water bodies, providing direct risk to aquatic biota and indirect human population, with the release of harmful secondary metabolites by cyanobacteria.

Keywords: cyanobacteria, microcystin, ciprofloxacin, chlorhexidine, blooms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA I. Circulação do grupo de antimicrobianos quinolônicos pelo ambiente até contaminação da água de distribuição pública. Fonte: Rodrigues-Silva et al, 2014.	21
FIGURA II. Estrutura química de ciprofloxacino. Fonte: El-Gamel, Hawash e Fahmey, 2012.	23
FIGURA III. Estrutura química do acetato de clorexidina. Fonte: Jou e Malek, 2016.	24
FIGURA IV. Floração de cianobactérias as margens do rio Tapajós, PA, Brasil.. Fonte: Sá et al, 2010.	27
FIGURA V. Estrutura química da hepatotoxina Microcistina (MC). X e Z representam a posição dos aminoácidos variáveis. Fonte: Merel et al, 2013.	30
FIGURA VI. Fatores de favorecimento da formação de florações de cianobactérias, produção de cianotoxinas e seu provável destino nos cursos d'água. Fonte: Merel et al, 2013 – adaptado.	31

ARTIGO I

FIGURA I. Crescimento de <i>M. aeruginosa</i> exposta à concentrações crescentes de (a) ciprofloxacino e (b) clorexidina, ao longo do tempo de experimento (96 horas).	42
FIGURA II. Crescimento de <i>M. panniformis</i> exposta à concentrações crescentes de (a) ciprofloxacino e (b) clorexidina, ao longo do tempo de experimento (96 horas).	43
FIGURA III. Taxa de crescimento médio de <i>M. aeruginosa</i> do controle e testes, em (a) exposta ao ciprofloxacino e em (b) exposta a clorexidina. Ensaio de 96 horas. (*) indica diferença significativa na redução da taxa de crescimento entre o controle e os testes, aceitando um nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$).	44
FIGURA IV. Taxa de crescimento médio de <i>M. panniformis</i> do controle e testes, em (a) exposta ao ciprofloxacino e em (b) exposta a clorexidina. Ensaio de 96 horas. (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$).	45
FIGURA V. Percentual de inibição de crescimento de culturas de <i>M. aeruginosa</i> expostas a concentrações crescentes de ciprofloxacino e de clorexidina após 96 horas	46
FIGURA VI. Percentual de inibição de crescimento de culturas de <i>M. panniformis</i> expostas a concentrações crescentes de ciprofloxacino e de clorexidina após 96 horas	46
FIGURA VII. Produção de clorofila-a por <i>M. aeruginosa</i> após 96 horas de exposição a concentrações crescentes de ciprofloxacino (a) e de clorexidina (b). O asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$). Em (b) não há diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$).	48

FIGURA VIII. Produção de clorofila-a por *M. panniformis* após 96 horas de exposição a concentrações crescentes de ciprofloxacino (a) e de clorexidina (b). O asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$). 48

ARTIGO 2

FIGURA I. Estrutura química da hepatotoxina Microcistina (MC). X e Z representam a posição dos aminoácidos variáveis

Fonte: Merel et al, 2013 58

FIGURA II. Produção de clorofila-a por célula ($\mu\text{g}/\text{célula}$) pelas linhagens de *Microcystis*: a. BA004; b. BA001; c. MIRF; d. NPJB; sob efeito de 0,015 mg/L de ciprofloxacino e 0,075 mg/L de clorexidina, após 96 horas de exposição. O asterisco (*) indica diferença significativa na produção de clorofila dos testes contra seus respectivos controles, aceitando um nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$). 66

FIGURA III. Produção de microcistina total, intracelular e extracelular por célula (ppb/célula) pelas linhagens de *Microcystis*: a. BA004; b. BA001; c. MIRF; d. NPJB; controle, teste com ciprofloxacino (0,015 mg/L) e teste com clorexidina (0,075 mg/L), após 96 horas de exposição. Método de ELISA. O asterisco (*) indica diferença significativa entre controles e testes ($P < 0,05$). 69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. Classificação das cianotoxinas e seus respectivos modos de ação. Fonte: Moreira et al, 2014.	29
TABELA 1. Incidentes em humanos relatados de mortalidade e morbidade atribuídos à exposição aguda à cianotoxinas, entre 1800-2010. Fonte: Wood, 2016 – adaptado.	32

ARTIGO 2

TABELA 1. Porcentagem de inibição de crescimento das linhagens de <i>Microcystis</i> expostas ao Ciprofloxacino ou a Clorexidina, após 96 horas de contato.	64
TABELA 2. Conteúdo de microcistinas total, intracelular e extracelular, expostas ao ciprofloxacino (0,015 mg/L) e clorexidina (0,075 mg/L) das linhagens de <i>Microcystis</i> BA004, BA001, MIRF e NPJB, após 96 horas.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANTX	Anatoxina
ASM-1	Meio de cultura de cianobactérias
BMAA	Ácido beta-N-metilamino-alanina
CIN	Cilindrospermopsina
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EC ₅₀	<i>Half Maximal Effective Concentration</i>
EPA-US	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
LD	Limite de detecção
LECT	Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias
LIMNEA	Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática
LQ	Limite de Quantificação
MC	Microcistina
Mcy	Enzima sintetizadora de microcistina
MC-LA	Variante de Microcistina
MC-LR	Variante de Microcistina
MC-RR	Variante de Microcistina
MC-YR	Variante de Microcistina
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NOD	Nodularina
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PERD	Parque Estadual do Rio Doce
PP1	Proteínas inibidoras das fosfatases 1
PP2A	Proteínas inibidoras das fosfatases 2 ^a

PP3	Proteínas inibidoras das fosfatases tipo 3
Ppb	Partes por bilhão
Ppm	Partes por milhão
PS-I	Fotossistema I
PS-II	Fotossistema II
RNA	Ácido Ribonucléico
STX	Saxitoxina
TFA	Ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	20
1.1.	Antimicrobianos no ambiente	20
1.1.1.	Ciprofloxacino	22
1.1.2.	Clorexidina	24
1.2.	Microrganismos do ambiente aquático	25
1.2.1.	Cianobactérias e florações	26
1.2.2.	Microcistinas	28
2.	OBJETIVOS	34
2.1.	Objetivo geral	34
2.2.	Objetivos específicos	34
3.	ARTIGO I: Efeitos toxicológicos de ciprofloxacino e clorexidina no crescimento e síntese de clorofila de microalgas de água doce	35
3.1.	Resumo	35
3.2.	Introdução	36
3.3.	Materiais e métodos	39
3.4.	Resultados e discussão	41
3.5.	Conclusão	49
3.6.	Agradecimentos	50
3.7.	Referências	51
4.	ARTIGO II: Efeitos tóxicos de Ciprofloxacino e Clorexidina em linhagens de cianobactérias produtoras de toxinas	56
4.1.	Resumo	56
4.2.	Introdução	57
4.3.	Materiais e métodos	60
4.4.	Resultados e discussão	63
4.5.	Conclusão	71
4.6.	Agradecimentos	72
4.7.	Referências	73
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
6.	CONCLUSÃO	80
7.	REFERÊNCIAS	81

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. Antimicrobianos no ambiente

A presença de antimicrobianos no meio aquático tem sido observada há quase 30 anos, e à medida que surgem novas tecnologias de detecção, aumenta-se a preocupação com a ocorrência dessa classe de medicamentos no ambiente. A potencial seleção e disseminação de cepas de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e seu impacto na terapia de doenças infecciosas é a principal preocupação com os resíduos ambientais dessa classe de medicamentos (Segura et al, 2009).

A dispersão de antimicrobianos no ambiente pode ocorrer por meio dos efluentes domésticos e hospitalares. Somam-se a esses os efluentes industriais e de produção animal. Os antimicrobianos podem atingir os cursos d'água de forma direta ou indireta pela lixiviação de solos e aterros (Fatta-Kassinos, Meric e Nikolaou, 2011).

A contaminação do ambiente por antimicrobianos decorrente das práticas de produção animal pode ocorrer pelo descarte direto do medicamento ou pelas excretas animais. No caso do esgoto doméstico e hospitalar grande parte dessas substâncias são provenientes das excretas humanas (Kummerer, 2010; Taylor e Senac, 2014).

Os medicamentos em geral possuem características que os fazem contaminantes com características especiais, a começar por suas moléculas com estruturas químicas complexas, polimórficas, com diversos sítios de ionização (Kummerer, 2010). E especificamente, antibióticos, pela sua natureza terapêutica, devem agir contra um organismo alvo (microrganismo causador da infecção) e devem ser estáveis em meio orgânico (organismo). Essas propriedades são exatamente as que os tornam problemáticos para o ambiente (Kummerer, 2009; Wang, Chu, 2016).

A entrada dos medicamentos no ambiente, em grande parte dos casos, se dá após passar por processo de metabolização no organismo, estando mais polares e mais solúveis, e retendo, pelo menos em parte, a atividade antimicrobiana. Porém, nem sempre a metabolização se dá de forma completa, podendo uma fração do fármaco ser excretada na forma inalterada ou como conjugado e esse, após hidrólise, retoma a forma ativa, junto com os metabólitos. A taxa de metabolização é específica para cada fármaco, podendo variar de 5 a 95% (Kummerer, 2010).

No meio aquático os fármacos podem sofrer processo de degradação completa ou incompleta pelos microrganismos do ambiente (bactérias e fungos), ou por processos abióticos, catalisado pela luz e outros processos químicos naturais, além de processos químicos induzidos pelos tratamentos de efluentes ou tratamento de água (oxidação, fotólise, hidrólise) (Hai A, Kummerer K. 2006; Groning et al 2007; Trautwein C, Metzger J, Kummerer K. 2009; Fatta-Kassinos, Meric e Nikolaou, 2011).

Dados sobre o consumo mundial de antibióticos são escassos e heterogêneos, mas estima-se que atinjam entre 100 a 200 mil toneladas por ano (Zhang, 2014). Não se tem informação disponível sobre o volume de produção e uso de antimicrobianos no Brasil, tampouco seu destino, mas estima-se que em 2010 esse setor tenha movimentado 22,1 bilhões de reais, 1,3 bilhões de antimicrobianos para a terapia humana e 1,5 bilhões para a produção/clínica animal (Rodrigues-Silva et al, 2014).

Na figura I é apresentada a origem e circulação do grupo de antimicrobianos quinolônicos da origem até a chegada à água de distribuição pública (Rodrigues-Silva et al, 2014).

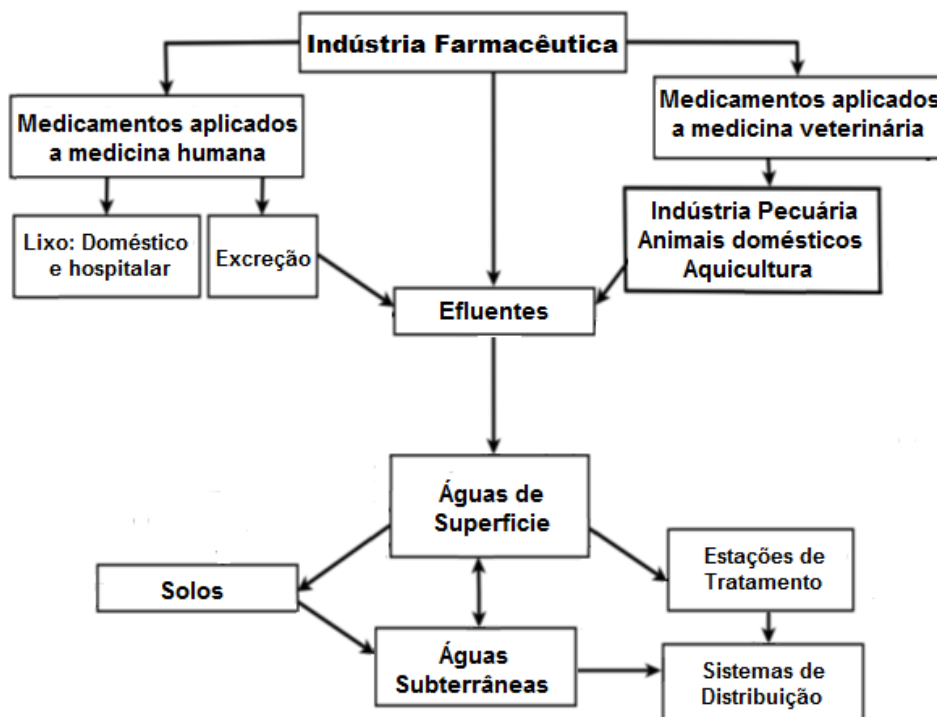


FIGURA I. Circulação do grupo de antimicrobianos quinolônicos pelo ambiente até contaminação da água de distribuição pública.

Fonte: Rodrigues-Silva et al, 2014.

Muito se tem discutido sobre a influência dos resíduos de antimicrobianos na emergência, seleção e disseminação de microrganismos resistentes, e por isso vem crescendo os estudos de monitoramento dessa classe de fármacos e seus efeitos no ambiente. Dentre os grupos de antimicrobianos usados na terapêutica, os mais identificados em matrizes como a água de rios, estações de tratamentos e até na água potável são as fluoroquinolonas e as sulfonamidas (Zhang, 2014).

Na água, as fluoroquinolonas já foram identificadas e quantificadas em diversos países da Europa (França, Espanha, Áustria, Holanda, Suíça, Grécia, Itália, Suécia), na Ásia (China, Vietnã, Taiwan) e Estados Unidos (Rodrigues-Silva et al, 2014). Das fluoroquinolonas de interesse, temos o ciprofloxacino, que é extensivamente prescrito devido à sua alta eficácia terapêutica e relativa baixa toxicidade (Chandran et al, 2014).

Além dos antimicrobianos estritos, existem muitas outras substâncias com atividade sobre microrganismos que são intensamente utilizadas em ambiente hospitalar, doméstico e industrial. Esses compostos usados para neutralizar, impedir ou destruir microrganismos indesejados ou nocivos recebem a denominação geral de biocidas.

1.1.1. Ciprofloxacino

O ciprofloxacino é um antimicrobiano do grupo das quinolonas de segunda geração denominadas fluoroquinolonas. Possuem amplo espectro de ação, sendo ativa contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, causadoras de doenças humanas e animais. Este fármaco apresenta metabolização e efeitos tóxicos bem documentados (Vasconcelos et al, 2009; Zhou e Jiang, 2015).

O alvo do ciprofloxacino é a enzima DNA-girase. A atividade antimicrobiana desse fármaco deve-se a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aceptores de ciprofloxacino com sítios ativos da enzima DNA-girase das bactérias. Essa enzima evita o envelhecimento da fita de DNA da bactéria durante e após sua duplicação. A ligação das moléculas do fármaco a essa enzima leva a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando inibição de crescimento e morte dos microrganismos (Rodrigues-Silva et al, 2014). Na figura II pode-se observar a estrutura básica de uma molécula de ciprofloxacino.

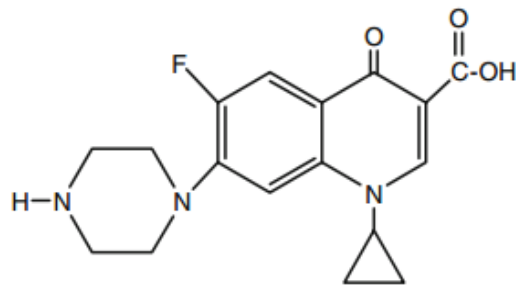


FIGURA II. Estrutura química de ciprofloxacino.

Fonte: El-Gamel, Hawash e Fahmey, 2012.

Do total da dose administrada em humanos, 45-62% é excretada não metabolizada pela urina e 15-25% através das fezes. Algumas fluoroquinolonas são utilizadas também na terapia animal, porém não há estudos sobre as taxas metabólicas por outras espécies. No ambiente, em alguns estudos foram encontradas concentrações de ciprofloxacina nas faixas de $\mu\text{g/L}$ e até mg/L , como ocorreu em estações de tratamento de águas residuárias de indústrias farmacêuticas na Índia (Le-Minh et al, 2010).

No efluente hospitalar, ciprofloxacino tem sido detectada em concentrações bastante elevadas, indicando seu extenso uso em humanos para fins terapêuticos (Segura et al, 2009; Rodrigues-Silva, et al, 2014). Este fármaco pertence à lista dos 10 fármacos com elevada prioridade no ciclo da água (Zhou e Jiang, 2015).

Nas estações de tratamento do esgoto, ciprofloxacino pode ser removido entre 80-90% por meio de adsorção ao lodo, sendo estabilizado. Já foram feitas análises da sua concentração em solos próximos de criações de animais, estando na faixa de 0,37-0,40 mg/Kg de solo, confirmando sua relevância ecotoxicológica para essa matriz (Girardi et al, 2011).

Devido às dificuldades de degradação de ciprofloxacino sugere-se para a sua remoção dos corpos d'água o uso da adsorção em lodo e flocos, com posterior decantação. Com essa técnica remove-se de 88 a 92% das fluoroquinolonas em fase aquosa (Girardi et al, 2011; Ou et al, 2016).

1.1.2. Clorexidina

O gluconato de clorexidina, acetato de clorexidina ou cloridrato de clorexidina são sais de clorexidina usados como desinfetante, antisséptico e conservante. Tem aplicação no campo odontológico, veterinário, e é componente de diversos produtos de uso doméstico como enxaguantes bucais, desinfetantes de ferimentos e sabonetes. Ela é utilizada há mais de 50 anos, tendo sido aprovada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA-US) para uso como desinfetante na agricultura e veterinária, para o manuseio de ovos, equipamentos de embalagem e processamento de carne e aves (Chantal et al, 2009).

No ambiente hospitalar a clorexidina é amplamente utilizada tanto para fins terapêuticos, como para desinfecção de feridas, limpeza, sanitização das mãos, desinfecção de instrumentos cirúrgicos, esterilização de instrumentos usados em procedimentos invasivos, dentre outros (Chantal et al, 2009).

O acetato de clorexidina (figura III) é um biocida catiônico da classe das biguanidas, com um amplo espectro de ação, baixa toxicidade humana e baixa atividade residual. É efetivo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como contra fungos, protozoários e alguns vírus (Cassir et al, 2015).

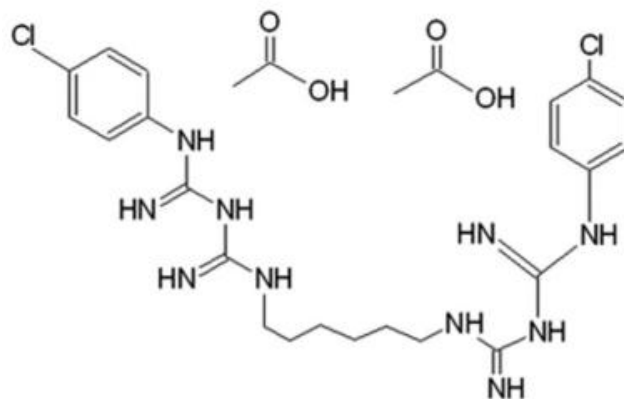


FIGURA III. Estrutura química do acetato de clorexidina.
Fonte: Jou e Malek, 2016.

Seu mecanismo de ação envolve a membrana celular, possivelmente alterando a fluidez, a ligação de enzimas e os mecanismos de osmorregulação, associado também com a perda da integridade da membrana celular causando danos (Bonez et al, 2013). É sabido que a

clorexidina pode inibir a utilização de oxigênio pela célula, e com isso a produção de energia, além de levar a danos ao DNA e inibição da síntese de proteínas (Condell et al, 2014).

Seu amplo uso tem despertado interesse quanto à suscetibilidade dos microrganismos com os quais ela entra em contato direto. Os resultados são conflitantes. Muitos autores não encontraram correlação significativa entre o uso de clorexidina e um aumento na resistência dos microrganismos estudados (Prag et al, 2013; Schlett et al, 2014; Ebrahimi et al, 2014), mas outros já consideram esse efeito e observaram um aumento da resistência por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiela*, *Serratia*, porém esse mecanismo de resistência ainda não foi elucidado (Chantal et al, 2009; Beier et al, 2014; Condell et al, 2014; Kulik et al, 2014; Rema et al, 2014).

1.2. Microrganismos do ambiente aquático

Dentre a infinidade de organismos do ambiente aquático, as algas, microalgas e cianobactérias correspondem a aproximadamente 70% da massa de fitoplâncton, sendo responsáveis por mais do que um terço da produção de O₂ ou fixação de CO₂ do planeta (Zhou J et al, 2016). Devido à ampla distribuição desses microrganismos, admite-se que eles sejam suscetíveis a medicamentos e a qualquer outra substância que de forma direta ou indireta chegam ao ambiente (Grinten et al, 2010).

Estudos apontam que a sensibilidade das algas aos antimicrobianos é variável de acordo com a espécie, mas as cianobactérias são consideradas um dos microrganismos mais sensíveis a essa classe (Holten-Lützhøft, Halling-Sørensen, Jørgensen, 1999; Halling-Sørensen et al, 2000). Estes microrganismos possuem estrutura morfofisiológica muito semelhante às bactérias gram-negativas. Elas podem desempenhar papel importante na difusão de genes de resistência antibacteriana, já que possuem plasmídeos e elementos transponíveis (Lin et al, 2011). Algumas linhagens de cianobactérias já exibiram atividade antibacteriana, além da própria resistência à antimicrobianos (Dias et al, 2015).

O potencial efeito adverso dos antimicrobianos sobre as algas e cianobactérias é preocupante, já que elas são a base da cadeia alimentar, e qualquer alteração na sua população pode afetar o equilíbrio do sistema aquático (Kummerer, 2009; Grinten et al, 2011; Fatta-Kassinou, Meric e Nicolaou, 2011).

1.2.1. Cianobactérias e florações

Cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes encontrados em diversos ambientes, como solos, rochas, oceanos e água doce. Acredita-se que elas tenham sido os primeiros organismos fotossintéticos produtores de oxigênio da terra e contribuído com a geração de oxigênio para a atmosfera há três bilhões de anos atrás (Ramanam et al, 2016). Estão presentes no ambiente como células livres, colônias ou filamentos. São organismos microscópicos, mas suas populações podem ser visíveis em grandes colônias, crostas e florações (Catherine et al, 2013).

As cianobactérias apresentam ampla distribuição geográfica, das regiões polares às tropicais, do hemisfério norte ao sul, dominando a produção planctônica e bentônica em muitos habitats. Essa existência tão extensa e tão diversa deve-se a sua grande capacidade adaptativa aos diferentes tipos de ambientes, desenvolvendo estratégias para garantir sua sobrevivência e dominância em ambientes aquáticos naturais e modificados pelo homem (Pearl e Paul, 2012).

Cianobactérias são capazes de grande captação e armazenamento de nutrientes, como nitrogênio, fósforo, ferro e traços de metais. Muitos gêneros possuem aerótopos, estruturas responsáveis por alterar a densidade das células, permitindo a exploração de águas mais profundas e ricas em nutrientes, ao mesmo tempo em que usufruem do ambiente com luminosidade na superfície (Kruk et al, 2010; Pearl e Paul, 2012). Outros gêneros conseguem formar relações simbióticas com diatomáceas, esponjas, corais, líquens, samambaias, e associações mutualísticas com uma variedade de outros microrganismos, proporcionando proteção e melhorando a ciclagem e disponibilidade de nutrientes em ambientes oligotróficos (Pearl e Paul, 2012; Ramanan et al, 2016).

Soares e colaboradores (2013) avaliaram o perfil de dominância das cianobactérias no Brasil, concluindo que há três gêneros prevalentes no ambiente, *Microcystis*, *Cylindrospermopsis* e *Dolichospermum*, concordando com a prevalência no resto do mundo. Os três gêneros compartilham de grande capacidade adaptativa, porém também mostram ter diferentes preferências ambientais que podem afetar sua ocorrência e dominância (Soares et al, 2013). O gênero *Microcystis* foi relatado com o maior biovolume de dominância e codominância, e dentro desse gênero, a espécie *Microcystis aeruginosa* é prevalente em corpos d'água (Soares et al, 2013).

A concentração de nutrientes como fósforo, nitrogênio e carbono é um fator chave para a eutrofização global das águas superficiais, e com isso o desencadeamento de um supercrescimento ou floração de cianobactérias (Merel et al, 2013). O grande crescimento populacional e a intensificação de atividades urbanas, industriais e da agricultura, pela deficiência de uma gestão de efluentes eficiente é a causa desse aumento da eutrofização das águas. Junto a isso, o aumento da temperatura global, pH e baixa turbulência da superfície dos corpos d'água favorecem o desenvolvimento exagerado de cianobactérias (Figueiredo et al, 2004; Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

Não existe uma definição ou quantificação do que é uma floração de cianobactérias, mas geralmente é considerado como uma produção significativa de biomassa ao longo de um período curto de tempo, correlacionado com uma diminuição da diversidade do fitoplâncton. Essa condição leva ao aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e anóxia nos corpos d'água, restringindo a sobrevivência de outras espécies (Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015). Florações são, na maioria das vezes, mono-específicas, podendo formar uma densa camada de células na superfície da água visível a olho nu, em ambientes urbanos (figura IV) ou ambientes naturais (Merel et al, 2013).



**FIGURA IV. Floração de cianobactérias as margens do rio Tapajós, PA, Brasil.
Fonte: Sá et al, 2010.**

A ocorrência de florações de cianobactérias nas águas superficiais pelo mundo tem sido reportada há mais de 130 anos, mas foi só nas últimas décadas que esses eventos se tornaram preocupantes, já que cada vez mais essa incidência se dá de forma mais intensa, associada também a perdas econômicas, além de causar impactos negativos na ecologia, na biogeoquímica e na saúde (O'neil et al, 2012; Perga et al, 2013).

Somente nos Estados Unidos, florações de cianobactérias resultam em prejuízos acima de dois bilhões de dólares anualmente, por perdas de recursos hídricos de uso humano, uso na agricultura e uso recreacional (Paerl, Hall e Calandrino, 2011, Chapman, 2015). As florações se tornaram, assim, um problema de saúde pública ao nível mundial e de importante preocupação ecológica (Liu et al, 2015).

Grande parte da mortalidade de cianobactérias é decorrente da produção de cianotoxinas, metabólitos secundários de algumas espécies, tais como microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas (Wood, 2016). Estas toxinas podem ter efeito deletério em reservatórios e em corpos de água à jusante de sistemas de abastecimento. Há mais de 40 espécies representando 20 gêneros de três ordens de cianobactérias conhecidas por produzir cianotoxinas. Estas incluem tanto peptídeos cíclicos quanto alcalóides (Gkelis et al, 2014).

Dentre os gêneros produtores de toxinas, os que normalmente têm se envolvido com incidentes são *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, e com menor frequência *Gomphosphaeria*, *Coelosphaerium*, *Gloeotrichia*, *Nodularia* e *Nostoc* (Codd, Morrison e Medcalf, 2005; Corbel, Mougin e Bouaicha, 2014).

1.2.2. Microcistinas

Microcistinas (MC) são cianotoxinas encontradas em maior quantidade nas florações de cianobactérias pelo mundo (40-75%) (Corbel, Mougin e Bouaicha, 2014). São produzidas pelas cianobactérias do gênero *Microcystis*, destacando-se as espécies *M. aeruginosa*, que é uma das mais encontradas nos ambientes eutrofizados em todo o mundo (Li et al, 2012), e a espécie *M. panniformis*, que é bastante encontrada em países tropicais do continente americano (Komarek et al, 2002; Nguyen et al, 2012; Zhang et al, 2016).

Existem mais de 90 variantes de microcistinas conhecidas (dentre essas MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-YR), que diferem de acordo com a posição de radicais de aminoácidos na molécula (Cassini, Antunes e Keller, 2013). Com relação à toxicidade aguda, a microcistina LR (MC-LR) é considerada a mais potente de seu grupo conhecido como hepatotoxinas (Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

Microcistinas fazem parte do grupo das hepatotoxinas, juntamente com as nodularinas (Quadro 1). Outras cianotoxinas incluem as neurotoxinas, como as anatoxinas, saxitoxinas e as BMAA (ácido beta-N-metilamino-alanina), citotoxinas e dermatotoxinas e toxinas irritantes gastrointestinais. Essas divisões correspondem ao modo de ação de cada toxina no organismo humano (Kujbida et al, 2006) e não à similaridade estrutural.

QUADRO 1. Classificação das cianotoxinas e seus respectivos modos de ação.

Fonte: Moreira et al, 2014.

Modo de ação no organismo	Tipo de cianotoxina
Hepatotoxinas	Microcistinas (MC)
	Nodularinas (NOD)
Citotoxinas	Cilindrospermopsinas (CIN)
Neurotoxinas	Saxitoxinas (STX)
	Anatoxinas (ANTX)
	BMAA
Dermatotoxinas	Lingbiatoxina
	Aplisiatoxina

Além da hepatotoxicidade, os efeitos das microcistinas na saúde humana são diversos, como gastroenterites, náuseas, vômitos, sintomas gripais, dor de garganta, irritação nos olhos e ouvidos, dores abdominais, distúrbios visuais, e lesões renais (Cood, GA, 2000; Codd, Morrison e Medcalf, 2005). Estudos relatam ainda a associação de câncer primário no fígado e colo retal, com exposição crônica à microcistina (Zhou L, Yu H, Chen K, 2002; Hernández J.M., López-Rodas V., Costas E, 2009).

As hepatotoxinas são potentes inibidoras das fosfatases1 (PP1) e 2A (PP2A), importantes enzimas reguladoras de vias metabólicas e respostas celulares em células eucarióticas, além de inibirem também as fosfatases tipo 3 (PP3), que podem ter influência similar as PP1 e PP2A. Muitos autores consideram sua capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células, de desorganizar o citoesqueleto, induzir a apoptose celular e danos ao

DNA, o que pode estimular a proliferação de células cancerosas (Maidana et al, 2006; Rastogi, Sinha, Incharoensakdi, 2014).

Muitos congêneres das hepatotoxinas são hidrofílicos, necessitando de uma via de transporte para entrar nas células, como a via de adenosina trifosfato, tornando sua ação restrita a esses tipos de células como as células do fígado. Por isso sua ação é mais intensa nesse órgão (Pantelic et al, 2013).

As microcistinas são extremamente persistentes em água e resistentes à lise química, devido a sua estrutura cíclica e a presença de nove aminoácidos que as deixam resistentes ao calor, hidrólise e oxidação (figura V). Elas podem ser decompostas lentamente por altas temperaturas, pH extremos, além de sofrerem biodegradação e fotodegradação, sob determinadas condições. Logo, em ambientes naturais ou não em que não há a presença desses fatores, a microcistina pode persistir por meses ou mesmo anos (Pantelic et al, 2013; Rastogi, Sinha, Incharoensakdi, 2014).

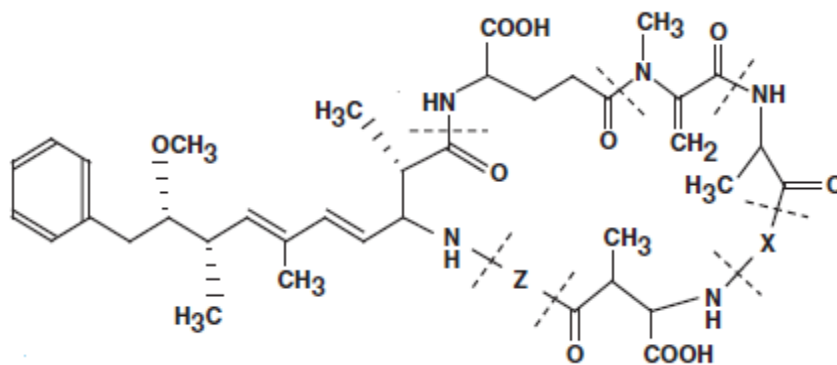


FIGURA V. Estrutura química da hepatotoxina Microcistina (MC). X e Z representam a posição dos aminoácidos variáveis.

Fonte: Merel et al, 2013.

A presença de microcistinas nos corpos d'água ocorre pela sua liberação a partir do rompimento da célula da cianobactéria, e isso não acontece somente após sua morte natural, podendo ocorrer após tratamentos químicos, como por exemplo, os algicidas, ou em um ambiente que se encontra no final de uma floração, no qual a célula está em extremo estresse (Corbel, Mougin e Bouaicha, 2014; Fan et al, 2014).

Os fatores que favorecem o desenvolvimento de florações de cianobactérias tóxicas, e o provável destino dessas cianotoxinas nos corpos d'água são apresentados na figura VI.

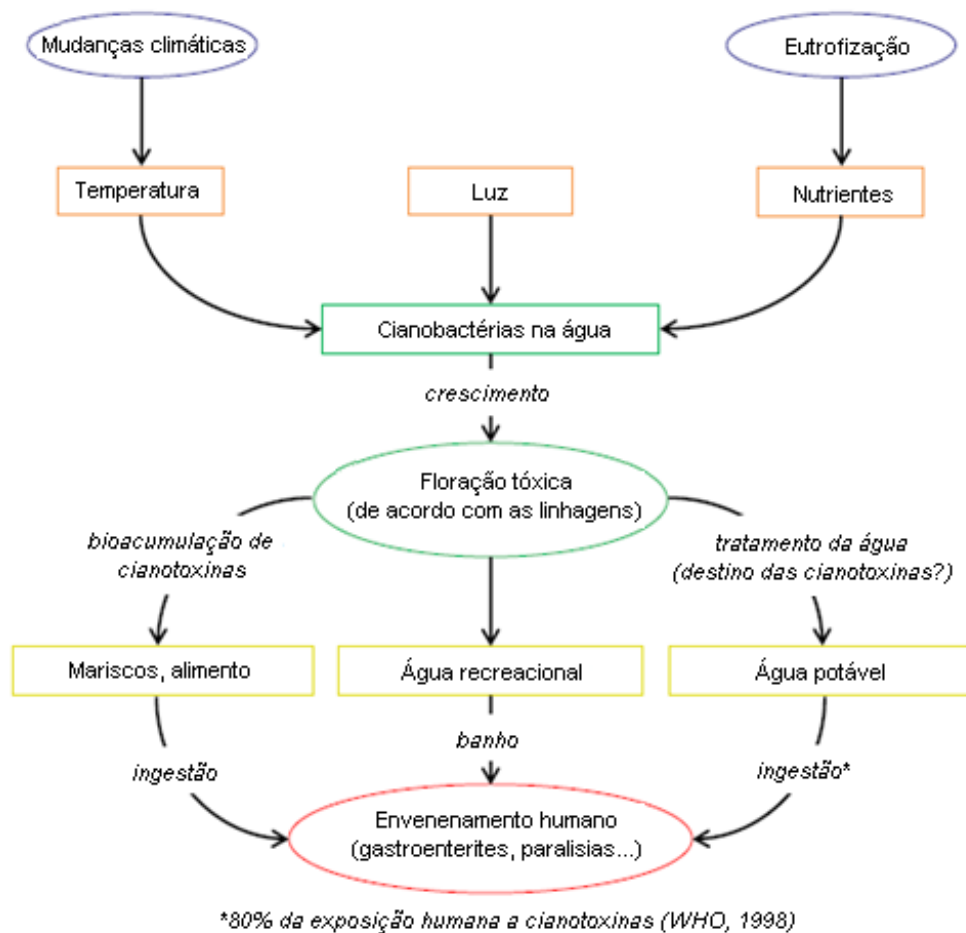


FIGURA VI. Fatores de favorecimento da formação de florações de cianobactérias, produção de cianotoxinas e seu provável destino nos cursos d'água.
Fonte: Merel et al, 2013 – adaptado.

As cianotoxinas presentes nos corpos d'água são responsáveis por envenenamento em humanos e animais selvagens e domésticos, por ingestão direta da água contaminada, contendo a toxina dissolvida ou com cianobactérias (Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

Já foram reportados diversos episódios de intoxicação por cianotoxinas em todo o mundo (tabela 1), desde o primeiro episódio notável, em 1930, nos EUA até os dias de hoje (Wood, 2016). No Brasil, foi registrado o maior acidente, sendo o primeiro episódio fatal de intoxicação por microcistinas, com a morte de 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise em Caruaru, Pernambuco (Pouria et al, 1998).

TABELA 1. Incidentes em humanos relatados de mortalidade e morbidade atribuídos à exposição aguda à cianotoxinas, entre 1800-2010.

Fonte: Wood, 2016 – adaptado.

	Número de incidentes
Total	115
<i>Localização</i>	
Austrália	9
Canadá	5
Europa	27
Estados Unidos	50
Resto do mundo	24
<i>Modo de exposição</i>	
Água potável/uso doméstico	27
Atividades recreacionais	65
Hemodiálise	3
Ocupacional	5
Outros ^a	15

^aIncluem incidentes onde nenhum modo de exposição foi especificado, ou uma combinação de modos de exposição

A partir desse episódio em Caruaru, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realizou uma avaliação dos níveis seguros de microcistinas em água potável, baseados em ensaios de toxicidade subcrônica em camundongos e porcos, calculando a dose diária tolerável e segura para o ser humano entre 1 e 2 µg/L (WHO, 1998).

Cada país adotou um limite padrão, sendo o Brasil o primeiro a estabelecer limites de microcistina em norma nacional, como força de lei. A portaria nº 1.469/2000 descreve procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade das águas para consumo humano, inserindo a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias em mananciais superficiais, e em 2004 a portaria nº 518 definiu valores guia máximos de 1,0 µg/L para equivalentes de microcistina em água potável (BRASIL, 2000; BRASIL, 2004), que foi mantido na atualização da Portaria em 2011 (BRASIL, 2011).

Muitos trabalhos também têm sido realizados com o intuito de avaliar o efeito que substâncias nocivas presentes no ambiente podem causar às cianobactérias, e seus efeitos sobre a produção e liberação de toxinas (Halling-Sorensen, 2000; Eguchi et al, 2004; Robinson, Belden, Lydy, 2005; Ando et al, 2007; Yang et al, 2009; Liu et al, 2012, 2012, 2014, 2015; Zhang et al, 2011; González-Pleiter et al, 2013; Zhou et al, 2013; Li, Geng e Yang, 2015, Liu et al, 2016). Estes estudos visam contribuir com a discussão sobre o impacto de resíduos químicos ao ecossistema, e às recorrentes florações de cianobactérias produtoras de toxinas que se acumulam nos corpos d'água.

Há uma questão ecológica intrínseca nessa discussão que sustenta que esses interferentes podem levar ao desequilíbrio ambiental, afetando cadeias alimentares inteiras e/ou se acumulando até chegar ao consumidor final, o homem. Esse aspecto nos remete à questão de saúde pública, que nos afeta direta ou indiretamente, considerando não só os resíduos bem como as toxinas produzidas pelas cianobactérias que por serem de difícil remoção podem chegar à população humana pelo contato direto com os corpos d'água, pela ingestão ou pelo consumo de espécies que acumulam as toxinas. Logo, um problema ambiental, a presença de cianotoxinas torna-se um grande problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do antimicrobiano ciprofloxacino e do biocida clorexidina sobre o crescimento e a produção de toxina por linhagens de cianobactérias do gênero *Microcystis*.

2.2. Objetivos específicos

Determinar as concentrações de clorexidina e ciprofloxacino que promovem a inibição de 50% do crescimento (EC₅₀) das cepas das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*.

Avaliar a produção de clorofila pelas linhagens de *Microcystis* em estudo quando expostas à clorexidina e ciprofloxacino.

Investigar a produção e liberação de microcistinas por culturas de *Microcystis* expostas ao ciprofloxacino e a clorexidina.

3. ARTIGO I: Efeitos toxicológicos de ciprofloxacino e clorexidina no crescimento e síntese de clorofila de microalgas de água doce

3.1. Resumo

A presença de resíduos de fármacos no ambiente aquático representa um desafio para a saúde pública, já que seus efeitos são pouco conhecidos e os métodos de tratamento da água nem sempre são capazes de eliminá-los. Nesse ambiente há uma grande diversidade de cianobactérias, microrganismos fotossintetizantes, extensamente encontrados no meio aquático, constituindo a base da cadeia alimentar. Determinou-se a concentração de antimicrobianociprofloxacino e do antisséptico clorexidina que inibe de 50% do crescimento (EC_{50}) de duas linhagens de cianobactérias: *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*. As linhagens se mostraram mais sensíveis ao antimicrobiano, comparado à clorexidina. As duas substâncias afetaram a produção de clorofila, sendo a inibição do fotossistema II um possível mecanismo de toxicidade. A presença desses resíduos no ambiente, mesmo em concentrações muito baixas, pode, potencialmente, interferir no equilíbrio da microbiota, afetando populações de produtores primários. Considerando que boa parte do esgoto nos países em desenvolvimento não é adequadamente tratada e a falta de estudos locais sobre a presença dessas substâncias em efluentes, esse estudo aponta a necessidade de medidas de monitoramento ambiental, evitando efeitos sobre a diversidade e equilíbrio da microflora aquática.

Unitermos: Cianobactéria, *Microcystis*, Ciprofloxacino, Clorexidina, Clorofila, inibição de crescimento.

3.2. Introdução

As últimas décadas têm sido marcadas pela intensificação das atividades produtivas com consequente maior geração de resíduos. No Brasil, os novos padrões de consumo, decorrentes da maior disponibilidade de bens e produtos, não foram acompanhados pela instalação de infraestrutura para o tratamento dos resíduos gerados. Destacam-se, no contexto dessa evolução produtiva, a introdução de novos fármacos, cada vez mais potentes, no mercado e a melhoria do acesso a medicamentos, levando a um processo de medicalização intensa da sociedade (Kummerer, 2010; Baran et al, 2011).

Essa realidade, comum a muitos países, tem implicações diretas no lançamento nas redes sanitárias de uma grande quantidade de resíduos de fármacos e de seus metabólitos (Le-Minh et al, 2010; Kummerer, 2010). Grande parte dos países ainda não consegue se adequar às boas práticas de gestão de resíduos (Kumaret al, 2015; Joshi et al, 2015), entre essas o monitoramento da presença e toxicidade de resíduos de fármacos na água. Pesquisas na Europa, Ásia e Oceania têm mostrado a presença desses resíduos nas redes sanitárias (Dorival-García et al, 2013), em corpos d'água receptores (Watkinson et al, 2009) e até na água potável (Yiruhan et al, 2010). Paralelamente, estudos demonstram que as estações de tratamento de esgoto não são efetivas na remoção total desses resíduos (Homem e Santos, 2011).

No Brasil, as legislações ambientais (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011) não prevêem a identificação analítica da presença de fármacos na água em ambiente natural, contudo, é previsto o uso de bioindicadores a fim de estimar a presença de componentes tóxicos no ambiente aquático. Entre esses bioindicadores encontram-se as cianobactérias.

Cianobactérias são microrganismos unicelulares, fotossintetizantes e cosmopolitas. Elas podem ser encontradas desde regiões polares a tropicais de diversos habitats, como lagoas, rios, oceanos, rochas e solos (Pearl e Paul, 2012; Catherine et al, 2013). Essa ubiquidade das cianobactérias se deve à sua grande capacidade de captar e armazenar nutrientes, como nitrogênio, fósforo, ferro e metais (Kruk et al, 2010) e às interações com outros organismos, como bactérias, líquens, corais, plantas superiores, e diversos outros, melhorando a disponibilidade de nutrientes e sua proteção (Pearl e Paul, 2012). Esses

organismos são produtores primários, controlando a cadeia trófica e podem se proliferar em ambientes fortemente impactados (Kummerer, 2009; Grintenet al, 2011).

Ambientes com excesso de nutrientes, calor, grande incidência de luz solar e baixa turbidez influenciam o crescimento e multiplicação das cianobactérias, na maioria das vezes visível nos corpos d'água, sendo denominadas florações (Wood, 2016). Embora as cianobactérias tenham papel essencial na regulação do equilíbrio do ecossistema aquático, o aumento significativo de sua biomassa em um curto período de tempo é uma ameaça aos reservatórios de água doce. Na maioria das vezes, as florações são monoespecíficas e determinam uma diminuição da diversidade do fitoplâncton e a liberação de metabólitos secundários, contaminando a água e comprometendo a sobrevivência de outras espécies (Merel et al, 2013; Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

O desequilíbrio do ecossistema aquático, com eliminação de populações microbianas sensíveis favorece a degradação local com possível contaminação por toxinas, além da degradação estética e sanitária (Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015; Liu et al, 2015). O fator que mais contribui para a eutrofização dos corpos d'água é o lançamento de esgoto nesses ambientes sem o adequado tratamento.

Tratando-se de resíduos no ambiente, os medicamentos e principalmente os antimicrobianos têm despertado interesse quanto a efeitos sobre a biota dos ambientes impactados (Kummerer, 2010). Justifica-se a preocupação com os antimicrobianos uma vez que não há seletividade quanto ao efeito citotóxico, atuando sobre os microorganismos aquáticos da mesma forma como atuam sobre os patógenos humanos (Kummerer, 2009; Wang, Chu, 2016).

Por serem representantes do grupo procarionte do fitoplâncton, as cianobactérias apresentam similaridade morfológica e bioquímica com bactérias gram negativas, inclusive aspatogênicas, sugerindo que os efeitos dos antimicrobianos possam interferir no equilíbrio do ecossistema aquático (Kummerer, 2009; Grinten et al, 2011; Fatta-Kassinou, Meric e Nicolaou, 2011). Sabe-se que a resistência a essas substâncias pode variar significativamente entre espécies e até entre linhagens de uma mesma espécie, o que traz preocupação quanto a seus efeitos sobre a dinâmica das populações aquáticas.

Além de efeitos diretos sobre a microbiota aquática, outra preocupação com o descarte de antimicrobianos em corpos d'água é a possível troca de genes de resistência entre espécies,

contribuindo para a emergência e disseminação de resistência de agentes patogênicos aos antimicrobianos de uso clínico (Linnet et al, 2011). É importante destacar que cianobactérias possuem os mesmos componentes relacionados à transmissão gênica que as bactérias, como plasmídeos e elementos transponíveis facilitadores da troca genética (Dias et al, 2015).

Dentre as cianobactérias, o gênero *Microcystis* é considerado o de maior dominância no ambiente global (Soares et al, 2013), além de ser um gênero produtor de metabólitos secundários, dentre eles potentes toxinas (Corbel, Mougín e Bouaicha, 2014). O rompimento das células causado por agentes tóxicos no ambiente pode ser um importante fator para a liberação de toxinas tornando-se um grave problema no tratamento da água (Fan et al, 2014), indicando a necessidade de avaliação direta ou indireta da presença de substâncias com potencial antimicrobiano no meio aquático.

No que se refere a resíduos de medicamentos no meio aquático, considera-se que o esgoto sanitário seja a principal fonte, além do descarte de medicamentos não utilizados e de efluentes industriais e hospitalares (Fatta-Kassinos, Meric e Nikolaou, 2011). Dentre os resíduos de antimicrobianos, as quinolonas são um dos grupos mais frequentemente encontrados em estudos já realizados. Dentro desse grupo, o Ciprofloxacino é considerado um dos maiores poluentes devido a sua estabilidade no meio aquático e sua extensa utilização no meio hospitalar e comunitário. Esse fármaco vem sendo detectado em efluentes em diversos lugares do mundo, inclusive no Brasil (Segura et al, 2009; Rodrigues-Silva, et al, 2014) pertencendo à lista dos 10 fármacos com elevada prioridade no ciclo de tratamento da água (Zhou e Jiang, 2015).

Do mesmo modo, os biocidas apresentam atividade antisséptica e podem agir inespecificamente sobre a microflora de diferentes ambientes. Em geral, atuam em doses mais altas do que aquelas de antimicrobianos de uso sistêmico. A Clorexidina é utilizada há mais de 50 anos, tendo múltiplas aplicações em função de sua excelente atividade antisséptica, largo espectro e baixo custo (Chantal et al, 2009). A associação entre o uso de clorexidina e o surgimento de resistência microbiana é ainda controversa (Prag et al, 2013; Schlett et al, 2014; Ebrahimi et al, 2014; Chantal et al, 2009; Beier et al, 2014; Condell et al, 2014; Kulik et al, 2014; Rema et al, 2014), porém, de um modo geral, seu uso é considerado seguro. No entanto, por se tratar de um sal quaternário, hidrossolúvel, estruturalmente relacionado aos detergentes e amplamente utilizado, justifica-se a avaliação de seus efeitos sobre componentes

da microflora aquática. Adicionalmente, a clorexidina pode dar origem a metabólitos tóxicos, sendo essa mais uma preocupação com o descarte desse antisséptico.

Nesse cenário, o conhecimento da suscetibilidade das linhagens de cianobactérias isoladas dos corpos d'água brasileiros, é uma contribuição para o entendimento da ação de poluentes ambientais e a prevenção de riscos ao ecossistema aquático.

Neste estudo, avaliou-se a suscetibilidade de *Microcystis aeruginosa* e de *Microcystis panniformis*, ao antimicrobiano ciprofloxacino e ao biocida clorexidina, ambos extensamente utilizados no campo médico, doméstico e na produção animal.

3.3. Materiais e métodos

Linhagens de cianobactérias As linhagens de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis* foram isoladas a partir de coletas de água no Parque Estadual do Rio Doce – Minas Gerais, identificadas por análise morfológica e mantidas no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) do Departamento de Biologia Geral / Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Substâncias teste A formulação comercial de Cloridrato de Ciprofloxacino foi adquirida do laboratório Eurofarma®, 2mg/mL, 200mL. O Digluconato de Clorexidina foi adquirido do laboratório Sigma®, 20% em H₂O, 100 mL.

Condições de cultivo e monitoramento As culturas de *M. aeruginosa* e *M. panniformis* foram cultivadas em meio ASM-1 (Gorham et al, 1964) e mantidas em câmaras de germinação, a 23.0°C ± 1°C e fotoperíodo 12h claro/12h escuro, sob intensidades luminosas entre 30-86 $\mu\text{mol.M}^{-2}.\text{S}^{-1}$.

O crescimento celular foi monitorado a cada 48 horas, durante 15 dias por contagem celular, avaliação quantitativa de clorofila-a e densidade óptica.

A contagem celular foi feita em câmara de contagem de *Fuchs-Rosenthal* (*New Optik*®), com coloração azul de tripan (um mL de cultura para 500 μL de solução azul de tripan 2%). Após sedimentação das células (10 minutos) foi realizada a contagem em microscópio óptico. A partir da contagem foi construída a curva de crescimento ao microscópio Olympus® CBA.

A densidade óptica foi determinada em alíquotas de 3,0 mL de cultura, por espectrometria no espectro do visível (espectrofotômetro Aquamate® Plus UV-VIS) em comprimento de onda de 700 nm.

Para a extração de clorofila foi feita a filtração à vácuo em filtros de fibra de vidro (Macherel-Nagel® GF-1) de uma alíquota de 10 mL de cultura. Aos filtros foram adicionados 5 mL de acetona 90% (Synth, P.A.), macerados e centrifugados a 320.000 g, 20 minutos a 4°C (Centrífuga Sigma® 4K15). As concentrações de clorofila-a foram determinadas por espectrometria no espectro visível dos sobrenadantes nas absorvâncias 647 nm, 664 nm, 630 nm e 750 nm, e calculadas de acordo com a equação tricromática de Jeffrey & Humphrey (1975).

Inibição de crescimento das cianobactérias por ciprofloxacino e por clorexidina Os testes de inibição de crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* e *M. panniformis* por ciprofloxacino e clorexidina foram realizados seguindo o protocolo OECD 201 *Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test* (2006).

Em erlenmeyers de 250 mL, em triplicata, contendo 100 mL do meio de cultura ASM-1, adicionaram-se 3 mL de inóculo de uma cultura inicial, resultando em uma cultura contendo cerca de 10^5 cel/mL. Os frascos foram mantidos a $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo 12h/12h, iluminação por luz fluorescente branca/fria e agitação contínua de aproximadamente 100 rotações por minuto. No início da fase logarítmica do crescimento das linhagens (10^6 cel/mL) foram adicionados à cada cultura as soluções recém preparadas de ciprofloxacino e clorexidina. As concentrações utilizadas foram baseadas em experimentos preliminares para determinação aproximada da faixa de inibição. O crescimento das culturas teste e controle foram monitorados após 24, 48, 72 e 96 horas pela medida da densidade óptica e clorofila.

Cálculo da inibição de crescimento (Ec50%) A partir das curvas de crescimento das linhagens foram calculadas as taxas médias de crescimento das cianobactérias usando-se a equação 1:

$$\mu_{i-j} = (\ln B_j - \ln B_i) / (t_j - t_i) \quad (1)$$

onde μ_{i-j} é a taxa média de crescimento específica do tempo i ao tempo j; t_i é o tempo inicial; t_j é o tempo final; B_i é a densidade óptica no tempo inicial; B_j é a densidade óptica no tempo final.

A partir das taxas de crescimento específicas foi determinada a porcentagem de inibição de crescimento, de acordo com a equação 2:

$$%I = 100 \times (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \quad (2)$$

onde %I é a porcentagem de inibição em uma taxa média de crescimento específico; μ_c é o μ do controle; μ_t é o μ do tratamento.

As concentrações de ciprofloxacino e clorexidina que levaram a 50% de inibição de crescimento das cianobactérias foram estabelecidas por interpolação gráfica, utilizando-se a equação da reta da curva de porcentagem de inibição em função da concentração da substância teste.

Análise estatística Para determinar se houve diferença significativa entre as curvas de crescimento e produção de clorofila entre controle e tratamentos foram realizados o teste ANOVA unifatorial e teste de Tukey, para $p < 0,05$.

3.4. Resultados e discussão

Inibição de crescimento de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis* por ciprofloxacino e clorexidina Foram realizados vários testes preliminares para determinação da faixa de inibição de crescimento das linhagens por ciprofloxacino e pela clorexidina. Para estes testes foram utilizadas razões de séries geométricas de 1,20; 1,70 e 1,90.

A partir desses resultados a série de razão 1,7 (0,0035 a 0,0294 mg/L) foi estabelecida como a de melhor dispersão dos pontos dentro da curva de inibição de *M. aeruginosa* por ciprofloxacino e a razão 1,2 (0,1137 a 0,2358 mg/L) por clorexidina. Já para *M. panniformis* a série de concentrações de ciprofloxacino foi de razão 1,9 (0,003 a 0,039 mg/L) e de clorexidina a mesma da *M. aeruginosa*.

Nas figuras I e II observa-se a variação no crescimento celular em função do tempo. Com ciprofloxacino, o crescimento tanto de *M. aeruginosa* quanto de *M. panniformis* reduziu-se acentuadamente com o tempo somente após 48 horas de experimento, de forma proporcional ao aumento da concentração do antimicrobiano (figuras I.a e II.a), sugerindo um efeito citotóxico da substância teste, compatível com o mecanismo de ação do ciprofloxacino.

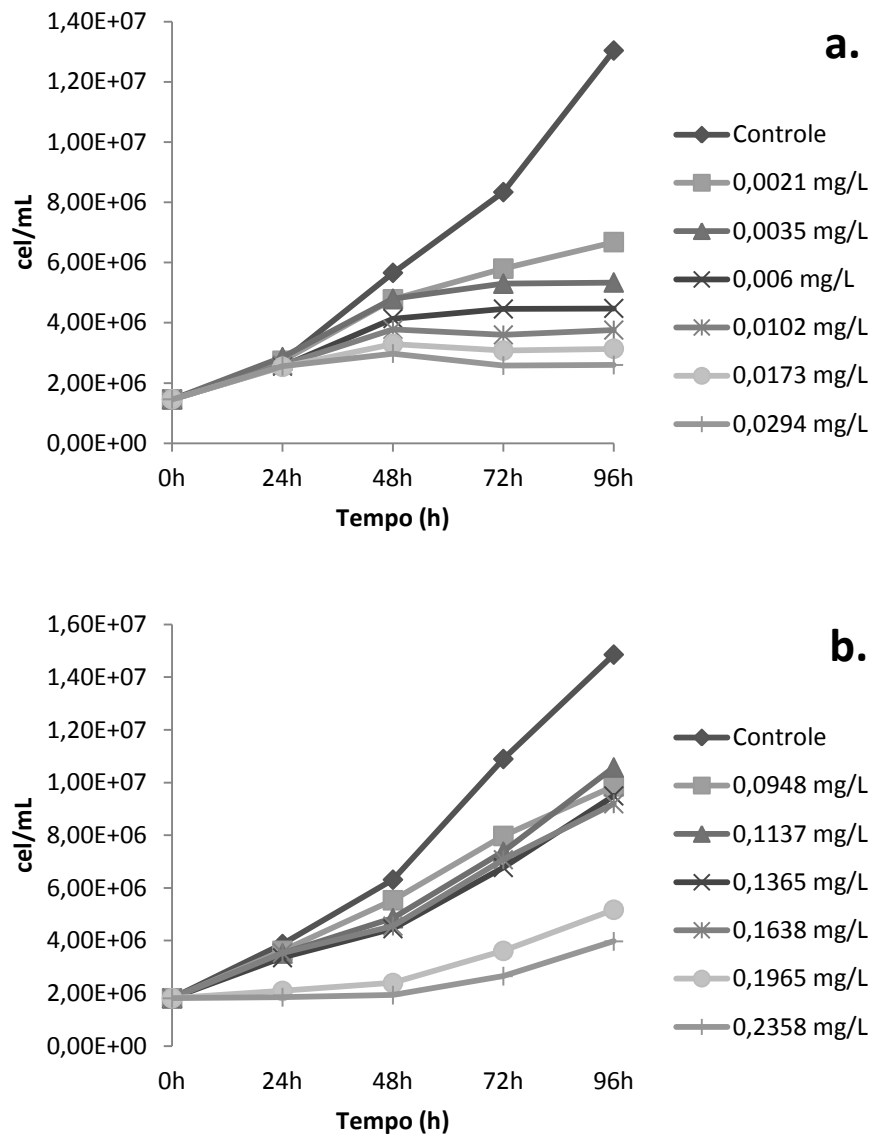


FIGURA I. Crescimento de *M. aeruginosa* exposta à concentrações crescentes de (a) ciprofloxacino e (b) cloxetidina, ao longo do tempo de experimento (96 horas).

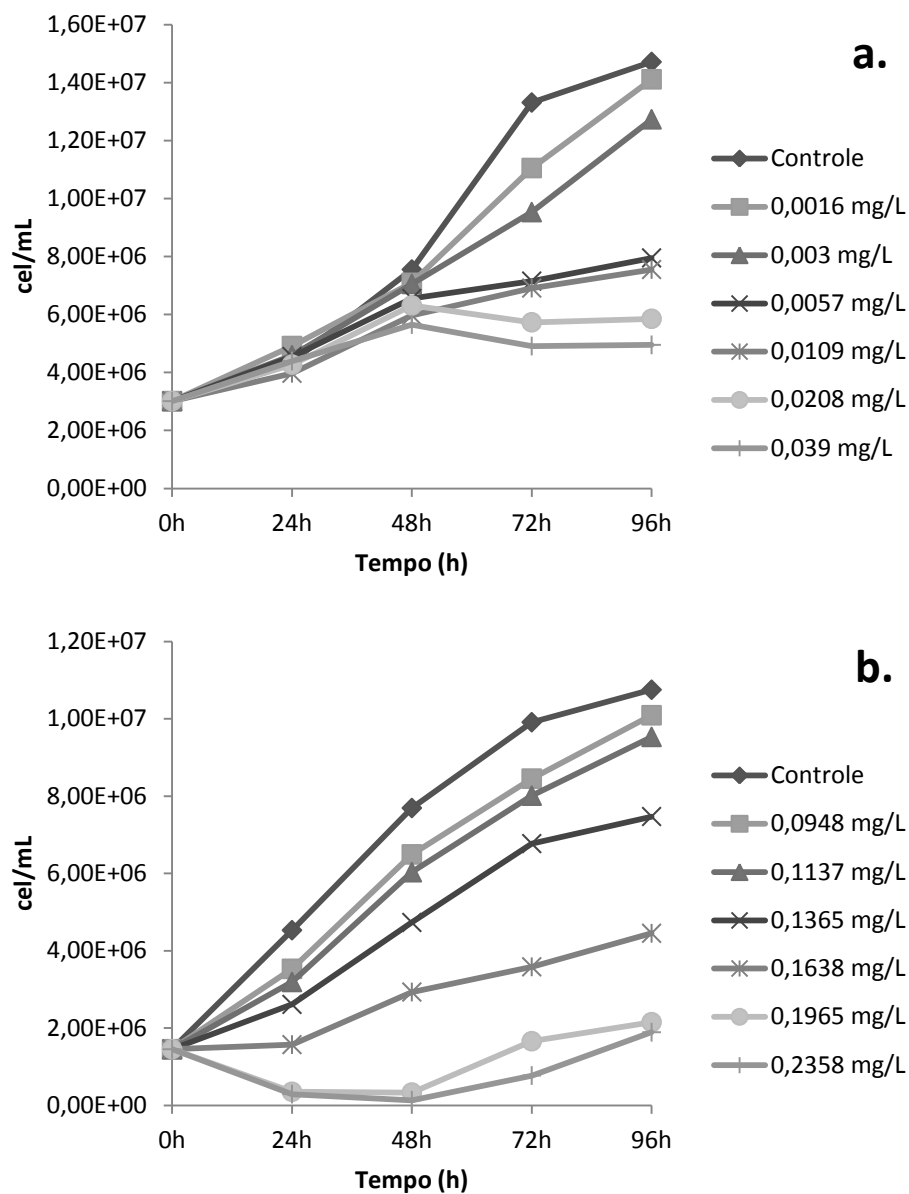


FIGURA II. Crescimento de *M. panniformis* exposta às concentrações crescentes de (a) ciprofloxacino e (b) clorexidina, ao longo do tempo de experimento (96 horas).

Observa-se que nas maiores concentrações testadas de clorexidina, ocorre inibição do crescimento das cianobactérias nas primeiras 48 horas, porém, a partir disso há uma tendência de retomada de crescimento. A recuperação da cultura pode ser decorrente de mecanismos de adaptação próprios das células. Outra possibilidade ou é a redução na concentração de clorexidina, uma vez que esse biocida pode sofrer degradação espontânea. Nesse caso, o pH, a presença de luz e a composição do meio de cultura poderiam acelerar esse processo (Tanaka et al, 2005). No entanto os produtos de degradação da clorexidina (para-cloroanilina, orto-

cloroanilina, meta-cloroanilina, espécies reativas de oxigênio e organoclorinas) são igualmente tóxicos, mas atuam por outros mecanismos (Câmara de Bem et al, 2014).

Nas figuras III e observa-se a redução da taxa de crescimento para as duas linhagens ao final das 96 horas de exposição às substâncias testes. As variações das taxas de crescimento foram inversamente proporcionais às concentrações de ciprofloxacino e de clorexidina e mostraram-se estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

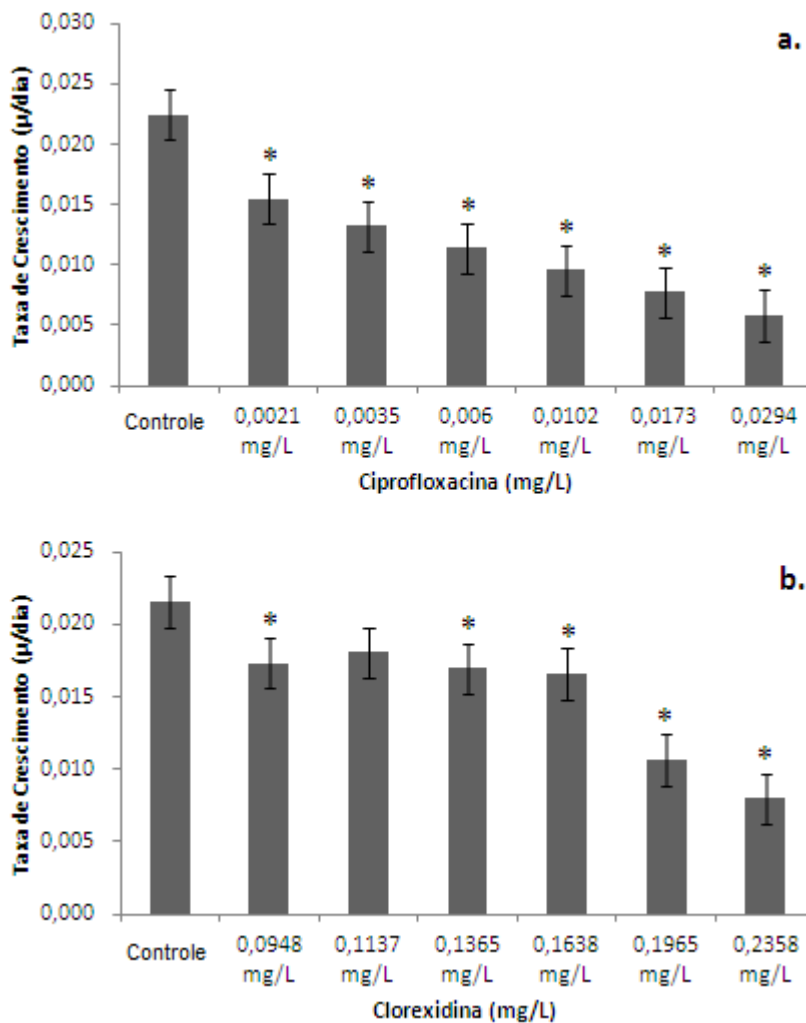


FIGURA III. Taxa de crescimento médio de *M. aeruginosa* do controle e testes, em (a) exposta ao ciprofloxacino e em (b) exposta a clorexidina. Ensaio de 96 horas. (*) indica diferença significativa na redução da taxa de crescimento entre o controle e os testes, aceitando um nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$).

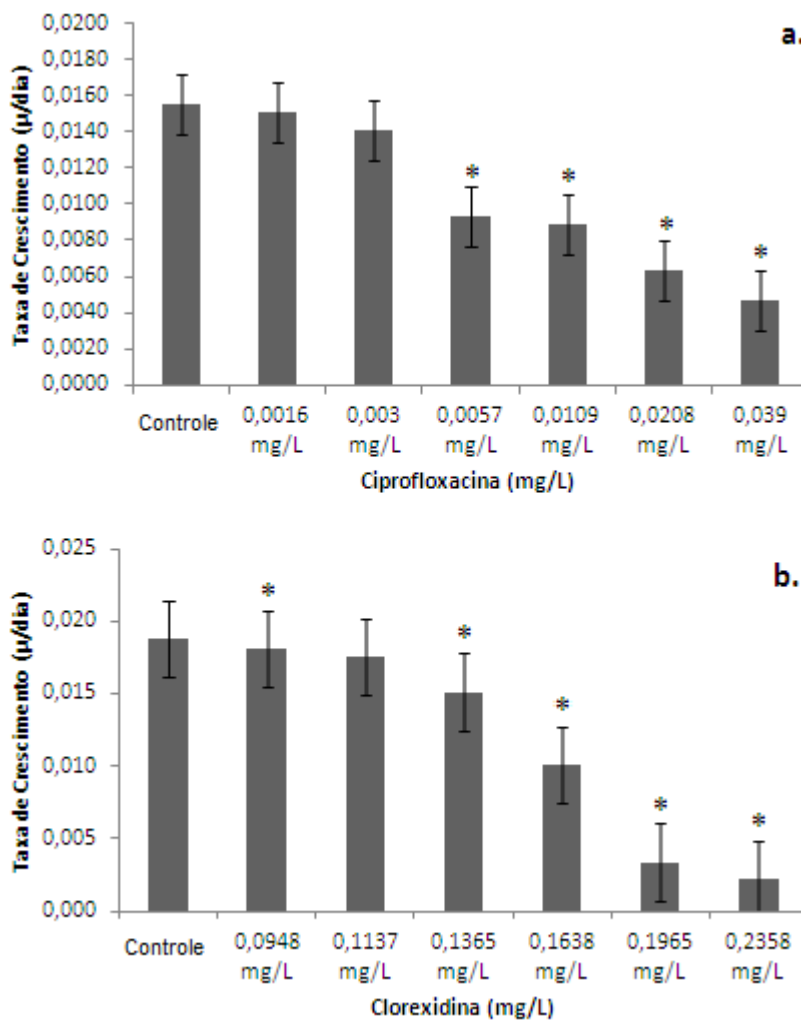


FIGURA IV. Taxa de crescimento médio de *M. panniformis* do controle e testes, em (a) exposta ao ciprofloxacino e em (b) exposta a clorexidina. Ensaio de 96 horas. (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$).

Verifica-se nos resultados diferenças consideráveis na tolerância das linhagens frente às duas substâncias. Ambas apresentaram maior sensibilidade ao ciprofloxacino, sendo a linhagem de *M. aeruginosa* mais sensível a fluoroquinolona que a *M. panniformis*. A resistência à clorexidina é similar entre as duas linhagens.

Ciprofloxacino é um antibiótico de amplo espectro, muito potente e estável (Vasconcelos et al, 2009), enquanto a clorexidina é um sal quaternário, hidrossolúvel o que limita sua absorção pela célula. Ciprofloxacino age sobre o DNA celular, inibindo sua duplicação. Isso implica em sua penetração na célula e um tempo maior para o início da ação bactericida (Rodrigues-Silva et al, 2014; Aldred, Kerns e Osheroff, 2014). Já a Clorexidina por encontrar-se ionizada no meio de cultura, tem limitações para a penetração na célula, agindo sobre a

parede celular dos microrganismos, perturbando a integridade e levando ao rompimento da membrana (Bonez et al, 2013; Cassir, 2015; Jou e Malek, 2016). Esse mecanismo é consistente com a rápida atividade bactericida, motivo pelo qual esse biocida é utilizado. Esse efeito inicial pode ser observado na curva de crescimento (figuras III e IV).

As curvas de inibição de crescimento em função das concentrações são apresentadas nas figuras V e VI. Por interpolação gráfica foi obtida a concentração que inibe 50% do crescimento de cianobactérias (EC_{50}).

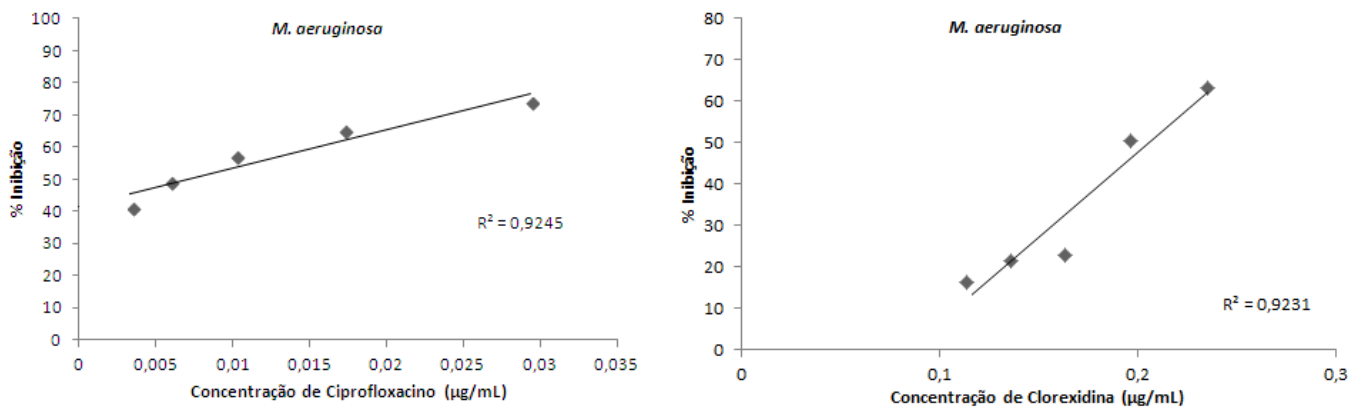


FIGURA V. Percentual de inibição de crescimento de culturas de *M. aeruginosa* expostas a concentrações crescentes de ciprofloxacino e de clorexidina após 96 horas.

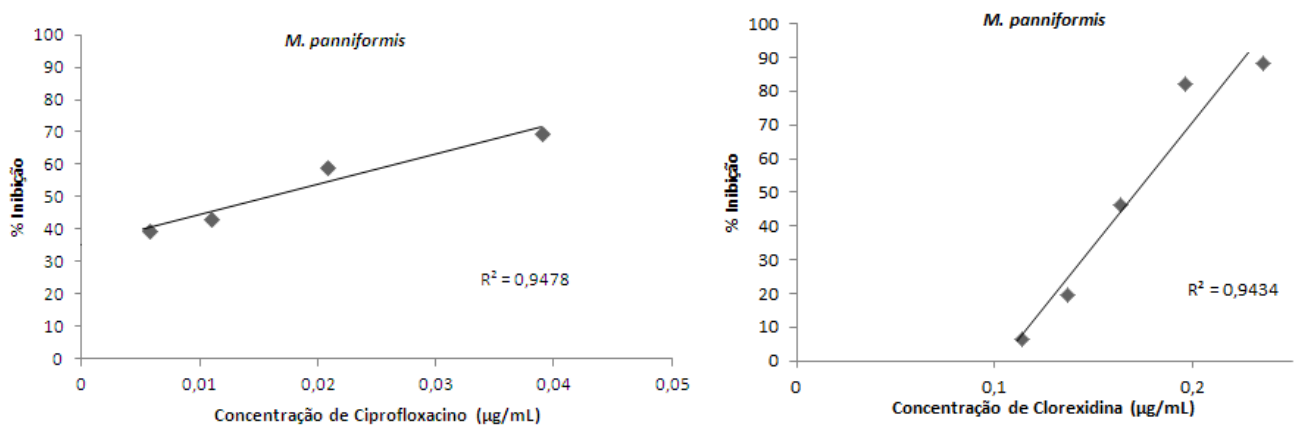


FIGURA VI. Percentual de inibição de crescimento de culturas de *M. panniformis* expostas a concentrações crescentes de ciprofloxacino e de clorexidina após 96 horas.

Sob as condições do teste, as concentrações estimadas de ciprofloxacino que inibem o crescimento celular em 50% são de 7 ppb para *M. aeruginosa* e 16 ppb para *M. panniformis*. Já para a clorexidina a EC_{50} para *M. aeruginosa* é de 206 ppb e 171 ppb para *M. panniformis*.

No caso do ciprofloxacino, estes resultados estão de acordo com os de Yasser et al (2015), que descrevem uma forte inibição de crescimento em concentrações muito baixas.

Na literatura há relatos de determinação de EC₅₀ de ciprofloxacino (Robinson et al, 2005; Halling-Sorensen et al, 2000) e da clorexidina (Lawrence et al, 2008) para *M. aeruginosa* e estas são compatíveis com os resultados encontrados em nosso estudo. Deve-se ressaltar que diferenças genéticas entre linhagens de uma mesma espécie proveniente de ambientes diversos podem ocorrer, conferindo maior resistência aos xenobióticos, particularmente espécies que vêm de locais com diferentes níveis de eutrofização. A linhagem de *M. aeruginosa* utilizada aqui é proveniente de lago oligotrófico de área de preservação ambiental. A sensibilidade semelhante às substâncias antimicrobianas da linhagem isolada do Parque Estadual do Rio Doce e daquelas utilizadas nos estudos de Robinson et al (2005), Halling-Sorensen et al (2000) e Lawrence et al (2008) sugere ser essa uma característica constitutiva, comum a diferentes linhagens de *M. aeruginosa*. Diferenças entre linhagens podem indicar variações genéticas adquiridas responsáveis pelos mecanismos de resistência, o que poderia representar risco de troca de materiais gênicos entre microrganismos aquáticos (Lin et al, 2011), sendo essa uma preocupação quando se trata de exposição a antimicrobianos de uso clínico. Embora não haja estudos de inibição de crescimento da *M. panniformis* frente à clorexidina ou ao ciprofloxacino, verifica-se comportamento semelhante à *M. aeruginosa* com sensibilidade maior à fluoroquinolona. Avaliações da resistência de diferentes espécies são necessárias do ponto de vista ambiental, pois podem indicar o risco de dominância de uma delas quando expostas ao xenobiótico no meio natural, já que estas espécies co-existem no mesmo ambiente.

A EC₅₀ para as linhagens em estudo são, em geral, inferiores à concentração inibitória mínima de algumas fluoroquinolonas para espécies patogênicas como *Mycobacterium tuberculosis* (MIC 0,25 a 2,0 mg/L) (Chen et al, 1989), *Enterobacteriaceae* (MIC 0,004 a 128 mg/L), *Pseudomonas* spp (MIC 0,015 a 128 mg/L), *Neisserias* spp (MIC 0,001 a 0,12 mg/L), *Haemophilus* spp. (MIC 0,002 a 0,06 mg/L) (Andrews, 2001) e *Salmonella typhimurium* (MIC 0,025 mg/L) (Diwan et al, 2010). Para as espécies do gênero *Microcystis*, por sua persistência em ambientes impactados, esperaria-se maior resistência às substâncias teste. Por outro lado, a sensibilidade observada a essas substâncias antimicrobianas sugere que essas espécies possam ser indicadoras de contaminação por esses poluentes em condições de laboratório. Espécies bioindicadoras devem apresentar como características alta disponibilidade no ambiente, boa representatividade de seu nível trófico, facilidade de cultivo,

reprodução e manejo laboratorial (Young et al, 2014). A *M. aeruginosa* e a *M. panniformis* cumprem esse papel.

Foi também avaliada a produção de clorofila pelas linhagens de *M. aeruginosa* e *M. panniformis* nas mesmas concentrações dos testes de inibição de crescimento. Os resultados são apresentados nas figuras VII e VIII.

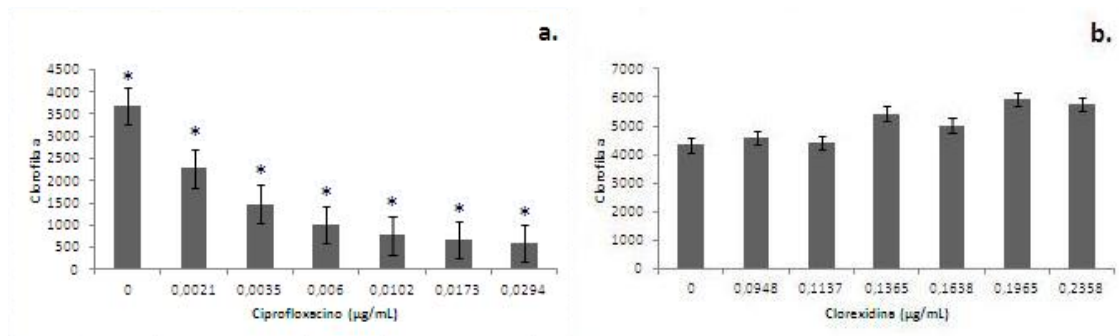


FIGURA VII. Produção de clorofila-a por *M. aeruginosa* após 96 horas de exposição a concentrações crescentes de ciprofloxacino (a) e de clorexidina (b). O asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$). Em (b) não há diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$).

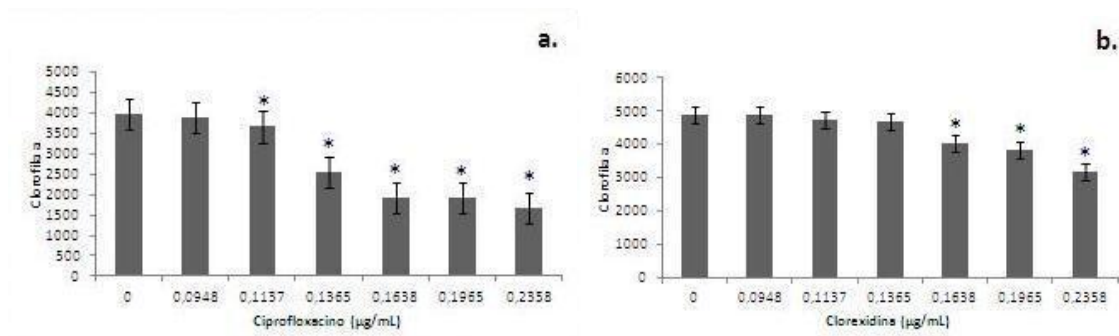


FIGURA VIII. Produção de clorofila-a por *M. panniformis* após 96 horas de exposição a concentrações crescentes de ciprofloxacino (a) e de clorexidina (b). O asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e os testes ($P < 0,05$).

Ao fazer-se a correção da clorofila total produzida pelo número de células de cada amostra, observou-se que ciprofloxacino promove um efeito inibitório sobre a produção de clorofila, estatisticamente significativo, em ambas as linhagens, nas concentrações mais altas, comparado aos seus respectivos controles (figuras VII.a, VIII.a), confirmando o observado por outros pesquisadores para vários antimicrobianos (Richards et al, 2004; Qian et al, 2012; Pan et al, 2009; Aristilde, Melis e Sposito, 2009; Liu et al, 2012). Segundo Aristilde, Melis e Sposito (2009), estruturas moleculares dos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, contendo um anel quinolônico e um grupo amino secundário, podem agir como inibidores das

enzimas-chave no transporte de elétrons no fotossistema II. Ciprofloxacino, especificamente, interfere na transferência de energia proveniente da excitação das moléculas nesse centro de reação PS-II (Deng, Pan e Zhang, 2015).

Já a clorexidina não mostrou diferenças significativas na produção de clorofila para a linhagem de *M. aeruginosa* (figura VII.b). Para *M. panniformis*, houve inibição na produção somente nas concentrações acima de 0,164 mg/L (figura VIII.b). Os resultados correlacionam com os observados para as curvas de inibição de crescimento (figuras V e VI).

Em estudo no Brasil, Martins e colaboradores (2008), analisando a presença de ciprofloxacino em efluente de hospital universitário de Santa Maria no Rio Grande do Sul, encontraram concentrações de ciprofloxacino da ordem de 0,054 mg/L. Concentrações elevadas foram também relatadas em efluentes hospitalares na Alemanha (Kummerer e Henninger, 2003), na Suíça (Hartmann et al, 1997), na Índia (Diwan, Lundborg e Tamhankar, 2013), na França (Mullot et al, 2010), e nos Estados Unidos (Brown, 2004). Tais concentrações são superiores às EC_{50} determinadas nesse estudo. Esses relatos são preocupantes diante dos achados de sensibilidade de linhagens *M. aeruginosa* e *M. panniformis* comuns em nosso meio, o que pode representar um risco para o ecossistema aquático em corpos d'água brasileiros.

3.5. Conclusão

Esse estudo permitiu determinar a EC_{50} de ciprofloxacino e da clorexidina para as linhagens de *M. aeruginosa* e de *M. panniformis*. Demonstrou-se a suscetibilidade dessas cianobactérias a substâncias ativas intensivamente utilizadas na terapêutica humana e animal na rotina industrial, hospitalar e comunitária, as quais podem afetar o crescimento e a produção de clorofila por esses microrganismos. A presença desses resíduos no ambiente, mesmo em concentrações baixas, pode interferir no equilíbrio da microbiota aquática, afetando populações de produtores primários. Considerando-se a precariedade do tratamento de esgotos no Brasil e a falta de estudos locais sobre a presença dessas substâncias em efluentes, pode-se supor que corpos receptores de efluentes hospitalares, industriais e domésticos podem conter resíduos tanto de ciprofloxacino quanto de clorexidina indicando a possibilidade de efeitos deletérios sobre a biota aquática.

Frente a escassez hídrica e a importância desse recurso natural é fundamental conhecer efeitos tóxicos de possíveis poluentes para a biota aquática. Os produtos farmacêuticos, por serem potencialmente tóxicos, devem ser cuidadosamente monitorados. As dificuldades operacionais dos processos analíticos podem constituir uma limitação desse monitoramento. Entre as contribuições desse estudo está a identificação de espécies muito sensíveis ao ciprofloxacino, podendo por método simples e de baixo custo contribuir para a detecção da presença de desse antimicrobiano no meio aquático.

3.6. Agradecimentos

Agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica e Laboratório de Análise de Água, da Faculdade de Farmácia, e ao Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, do qual proporcionou a realização deste trabalho.

3.7. Referências

- ALDRED KJ, KERNS RJ, OSHEROFF N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, Nashville, v.53, p.1565–1574, 2014.
- ANDO T, NAGASE H, EGUCHI K, HIROOKA T, NAKAMURA T, MIYAMOTO K, HIRATA K.. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agentes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Osaka, v.26, n.4, p.601–606, 2007.
- ANDREWS JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Birmingham, v.48, p.5-16, 2001.
- ARISTILDE L, MELIS A, SPOSITO G. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environmental Science Technology*, Berkeley, v.44, p.1444–1450, 2010.
- BARAN AW, ADAMEK E, ZIEMIANSKA J, SOBCZAK A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, Sosnowiec, v.196, p.1– 15, 2011.
- BEIER RC, FOLEY SL, DAVIDSON MK, WHITE DG, MCDERMOTT PF, BODEIS-JONES S, ZHAO S, ANDREWS K, CRIPPEN TL, SHEFFIELD CL, POOLE TL, ANDERSON RC, NISBET DJ.. Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994–2003. *Journal of Applied Microbiology*, Texas, v.118, p.326-342, 2014.
- BONEZ PC, DOS SANTOS ALVES CF, DALMOLIN TV, AGERTT VA, MIZDAL CR, FLORES VDA C, MARQUES JB, SANTOS RC, ANRAKU DE CAMPOS MM. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*. Santa Maria, v. 41, p. e119-e122, 2013.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n° 357: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n° 430: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. 2011.
- BROWN. K.D. Pharmaceutically Active Compounds in Residential and Hospital Effluent, Municipal Wastewater, and the Rio Grande in Albuquerque, New Mexico. 2004. Professional Project (Masters of Water Resources) – Water Resources Program, University of New Mexico, Albuquerque, 2004.
- CÂMARA DE BEM SH, ESTRELA C, GUEDES DFC, SOUSA-NETO MD, PÉCORÁ JD. Determination of chemical components derived from 2% chlorhexidine gel degradation using gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Odontologica Scandinavica*, v.72 , n.8, 2014.
- CASSIR N, THOMAS G., HRAIECH S., BRUNET J., FOURNIER PE., LA SCOLA B., PAPAIZIAN L. Chlorhexidine daily bathing: Impact on health care -associated infections caused by gram-negative bacteria. *American Journal of Infection Control xxx*, Marseille, p. 1-4, 2015.
- CATHERINE Q, SUSANNA W, ISIDORA ES, MARK H, AURÉLIE V, JEAN-FRANÇOIS H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e ecology, toxin production and risk management. *Water research*, Paris, v. 47, p. 5464-5479, 2013.
- CHANTAL W, JANG HJ, TOGHROL F, BENTLEY WE. Global transcriptomic response of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorhexidine diacetate. *Environ. Sci. Technol*, Maryland, v.43, p.8406–8415, 2009.
- CHEN CH, SHIH JF, LINDHOLM-LEVY PJ, HEIFETS LB. Minimal Inhibitory Concentrations of Rifabutin, Ciprofloxacin, and Ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* isolated before treatment of patients in Taiwan. *American Review of Respiratory Disease*, Taiwan, v.140, n.4, p.987-989, 1989.
- CONDELL O, POWER KA, HÄNDLER K, FINN S, SHERIDAN A, SERGEANT K, RENAUT J, BURGESS CM, HINTON JC, NALLY JE, FANNING S. Comparative analysis of *Salmonella* susceptibility and tolerance to

- the biocide chlorhexidine identifies complex cellular defense network. *Frontiers in microbiology*, Dublin, v.5, n.373, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00373.
- CORBEL S, MOUGIN C, BOUAICHA N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, Versailles, v. 96, p. 1–15, 2014.
- DIAS E, OLIVEIRA M, JONES-DIAS D, VASCONCELOS V, FERREIRA E, MANAGEIRO V, CANIÇA M. Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater *Cyanobacteria* spp. *Frontiers in Microbiology*. Lisboa, v. 6, n. 799, 2015.
- DENG C, PAN X, ZHANG D. Influence of ofloxacin on photosystems I and II activities of *Microcystis aeruginosa* and the potential role of cyclic electron flow. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Kunming, v.119, n.2, p.159-164, 2015.
- DORIVAL-GARCÍA N, ZAFRA-GÓMEZ A, CANTARERO S, NAVALÓN A, VÍLCHEZ JL. Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v.106, p.323-333, 2013.
- DIWAN V, LUNDBORG CS, TAMHANKAR AJ. Seasonal and temporal variation in release of antibiotics in hospital wastewater: estimation using continuous and grab sampling. *PLoS One*. Stockholm, v.8, n.7, 2013.
- DIWAN V, TAMHANKAR AJ, KHANDAL RK, SEN S, AGGARWAL M, MAROTHI Y, IYER RV, SUNDBLAD-TONDESKI K, STÅLSBY- LUNDBORG C. Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain, India. *BMC Public Health*, Solna. Publicado online: 10.1186/1471-2458-10-414, 2010.
- EBRAHIMI A, HEMATI M, HABIBIAN DEHKORDI S, BAHADORAN S, KHOSHNOOD S, KHUBANI S, DOKHT FARAJ M, HAKIMI ALNI R. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, Shahrekord, v.9, n.2, 2014.
- FAN J, HOBSON P, HO L, DALY R, BROOKES J. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, Adelaide, v. 264, p. 313– 322, 2014.
- FATTA-KASSINOS D, MERIC S, NIKOLAOU A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*, Cyprus, v. 399, p.251–275, 2011.
- GORHAM, P.R, J MCLACHLAN, UT HAMMER, WK KIM. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. v. 15, p.796-804, 1964.
- GRINTEN E, PIKKEMAAT MG, VAN DEN BRANDHOF EJ, STROOMBERG GJ, KRAAK MH. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. Bilthoven, v. 80, p. 1–6, 2010.
- HALLING-SØRENSEN B, LÜTZHØFT HC, ANDERSEN HR, INGERSLEV F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Copenhagen. v. 46, n. 1,p. 53–58, 2000.
- HARTMANN A, ALDER AC, KOLLER T, WIDMER RM. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuc genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental toxicology and chemistry*, Du'rbendorf, v.17, n.3, p.377–382, 1998.
- HOICZYK E, HANSEL A. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *Journal Of Bacteriology*, New York, v.182, n.5, p.1191–1199, 2000.
- HOMEM V, SANTOS L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *Journal of Environmental Management*, Porto, v.92, p.2304-2347, 2011.

- JEFFREY SW, HUMPHREY GF. New espectrofotometric equations for determining chlorophylls a,b, c and c2 in higher plants, algal and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. Bd.167, p. 191-194, 1975.
- JOSHI SC, DIWAN V, TAMHANKAR AJ, JOSHI R, SHAH H, SHARMA M, PATHAK A, MACADEN R, LUNDBORG CS. Staff perception on biomedical or health care waste management: a qualitative study in a rural tertiary care hospital in India. *PLoS ONE*, v.10, n.5. e0128383. doi:10.1371/ journal.pone.0128383. 2015.
- JOU S., MALEK N. Characterization and antibacterial activity of chlorhexidine loaded silver-kaolinite. *Applied Clay Science*, Skudai, p.127–128, 2016.
- KULIK EM, WALTIMO T, WEIGER R, SCHWEIZER I, LENKEIT K, FILIPUZZI-JENNY E, WALTER C. Development of resistance of mutans *streptococci* and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clin Oral Invest*, Basel, Publicado online: DOI 10.1007/s00784-014-1379-y, 2014.
- KUMAR R, SHAIKH BT, SOMRONGTHONG R, CHAPMAN RS. Practices and challenges of infectious waste management: A qualitative descriptive study from tertiary care hospitals in Pakistan. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, Islamabad, v.31, n.4, p.795-798, 2015.
- KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, Freiburg, v.75, p.417–434, 2009.
- KUMMERER K, Pharmaceuticals in the environment. *Annu. Rev. Environ. Resour*, Freiburg, v.35, p.57–75, 2010.
- KÜMMERER K, HENNINGER A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical, Microbiology and Infection*, Freiburg, v.9, p.1203-1214, 2003.
- KRUK C, HUSZAR V, PEETERS E, BONILLA S, COSTA L, LURLING M, REYNOLDS C, SCHEFFER M. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, Montevideo. v. 55, p. 614–627, 2010.
- LAWRENCE J, ZHU B, SWERHONE GD, TOPP E, ROY J, WASSENAAR LI, REMA T, KORBER DR. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Applied And Environmental Microbiology*, Saskatchewan, v.74, n.11, p. 3541–3550, 2008.
- LE-MINH N, KHAN SJ, DREWES JE, STUETZ RM. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, New South Wales, v. 44, p.4295-4323, 2010.
- LIN S, HAAS S, ZEMOJTEL T, XIAO P, VINGRON M, LI R.. Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. *Gene*, v. 473, p. 139–149, 2011.
- LIU Y, GUAN Y, GAO B, YUE Q. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Jinan, v.86, p.23–30, 2012.
- LIU Y, WANG F, CHEN X, ZHANG J, GAO B. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Jinan. v. 111, p. 138–145, 2015.
- MARTINS AF, VASCONCELOS T, HENRIQUES D, FRANK C, KÖNIG A, KÜMMERER K. Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. *Clean, Soil, Air, Water*, Santa Maria, v.36, n.3, p.264–269, 2008.
- MEREL S, WALKER D, CHICANA R, SNYDER S, BAURÈS E, THOMAS O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, Tucson, v.59, p.303–327, 2013.
- MULLOT JU, KAROLAK S, FONTOVA A, LEVI Y. Modeling of hospital wastewater pollution by pharmaceuticals: first results of Mediflux study carried out in three French hospitals. *Water science and technology*. Châtenay-Malabry, v.62, n.12, p.2912-2919, 2010.
- OECD GUIDELINE 201. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. 2006.

- PAN X, ZHANG D, CHEN X, MU G, LI L, BAO A. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. *Chemosphere*, Urumqi, v.77, p.413–418, 2009.
- PAERL HW, PAUL VJ. Climate change: Links to global expansion of harmful Cyanobacteria. *Water research*, Morehead City, v.46, p.1349-1363, 2012.
- PRAG G, FALK-BRYNHILDESEN K, JACOBSSON S, HELLMARK B, UNEMO M, SÖDERQUIST B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS*, Orebro, v.122, p.961–967, 2014.
- QIAN H, LI J, PAN X, SUN Z, YE C, JIN G, FU Z. Effects of Streptomycin on Growth of Algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology*, Hangzhou, p.229-237, 2010.
- RASTOGI RP, MADAMWAR D, INCHAROENSAKDI A. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, Bangkok, v. 6 n. 1254, p. 1-22, 2015.
- REMA T, LAWRENCE JR, DYNES JJ, HITCHCOCK AP, KORBER DR. Microscopic and spectroscopic analyses of chlorhexidine tolerance in *Delftia acidovorans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Saskatchewan, v.58, n.10 p. 5673–5686, 2014.
- RICHARDS SM, WILSON CJ, JOHNSON DJ, CASTLE DM, LAM M, MABURY SA, SIBLEY PK, SOLOMON KR. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental toxicology and chemistry*, Tennessee, v.23, n.4, p.1035–1042, 2004.
- ROBINSON AA, BELDEN JB, LYDY MJ. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Carbondale, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.
- RODRIGUES-SILVA C, MANIERO M, PERES M, GUIMARÃES JR. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. *Quim. Nova*, Campinas, v.37, n.5, p.868-885, 2014.
- SCHLETT CD, MILLAR EV, CRAWFORD KB, CUI T, LANIER JB, TRIBBLE DR, ELLIS MW. Prevalence of Chlorhexidine-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* following Prolonged Exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Maryland, v.58, n.8, p. 4404–4410, 2014.
- SEGURA PA, FRANÇOIS M, GAGNON C, SAUVÉ S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental Health Perspectives*, v.117, n.5, p. 675, 2009.
- SOARES MCS, HUSZAR V, MIRANDA M, MELLO M, ROLAND F, LÜRLING M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*, Juiz de Fora, v.717, p.1–12, 2013.
- TANAKA T, MURAYAMA S, TUDA N, NISHIYAMA M, NAKAGAWA K, MATSUO Y, ISOHAMA Y, KIDOA Y. Microbial degradation of disinfectants. A new chlorhexidine degradation intermediate (CHDI), CHDI-C, produced by *Pseudomonas* sp. Strain n° A-3. *Journal of Health Science*, Kumamoto, v.51, n.3, p.357-361, 2005.
- VASCONCELOS T, KÜMMERER K, HENRIQUES DM, MARTINS AF. Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. *Journal of Hazardous Materials*, Santa Maria, v.169, p.1154–1158, 2009.
- WANG J, CHU L. Irradiation treatment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in water and wastewater: An overview. *Radiation Physics and Chemistry*. Beijing, v. 125, p. 56–64, 2016.
- WATKINSON AJ, MURBY EJ, KOLPIN DW, COSTANZO SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*, v.407, n.8, p.2711–2723, 2009.
- WOOD R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. *Environment International*. Perth. v. 91, p. 276–282, 2016.

YASSER ELN, ADLI A. Toxicity of Single and Mixtures of Antibiotics to *Cyanobacteria*. *J Environ Anal Toxicol* v.5, p.274, 2015.

YIRUHAN, WANG QJ, MO CH, LI YW, GAO P, TAI YP, ZHANG Y, RUAN ZL, XU JW. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environmental Pollution*, v.158, n.7, p.2350–2358, 2010.

YOUNG SS, YANG HN, HUANG DJ, LIU SM, HUANG YH, CHIANG CT, LIU JW. Using benthic macroinvertebrate and fish communities as bioindicators of the Tanshui river basin around the greater taipei area — multivariate analysis of spatial variation related to levels of water pollution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Hsinchu, v.11, n.7, p.7116–7143, 2014.

ZHOU Z, JIANG JQ. Reaction kinetics and oxidation products formation in the degradation of ciprofloxacin and ibuprofen by ferrate (VI). *Chemosphere*. Glasgow, v. 119, p. S95–S100, 2015.

4. ARTIGO II: Efeitos tóxicos de Ciprofloxacino e Clorexidina em linhagens de cianobactérias produtoras de toxinas

4.1. Resumo

Cianobactérias são microrganismos fotossintéticos amplamente distribuídos nos ambientes aquáticos e terrestres, e muito suscetíveis ao estresse local, sendo consideradas bioindicadoras de poluição ambiental. Elas são produtoras de metabólitos secundários e dentre eles, toxinas, que afetam a biota aquática e os homens via ingestão direta da água. Muitos trabalhos têm avaliado a presença de biocidas e antimicrobianos residuais, que atingem os corpos d'água pelos efluentes industriais, hospitalares e domésticos, podendo entrar em contato com microrganismos e afetá-los diretamente, incluindo as cianobactérias produtoras de toxinas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do antimicrobiano ciprofloxacino, e do biocida clorexidina em linhagens de *Microcystis*, alterando a produção da toxina microcistina em meio de cultura e condições controladas em laboratório. Três das quatro linhagens de *Microcystis* apresentaram um aumento na produção de toxinas sob efeito de ciprofloxacino, e duas das quatro linhagens apresentaram um aumento na produção de toxinas sob efeito de clorexidina. A liberação da toxina também se mostrou variável. A presença desses resíduos no ambiente podem afetar diretamente a microbiota, causando desequilíbrios. São necessários mais estudos sobre o efeito dessas substâncias cada vez mais presentes nos corpos d'água, e nas consequências que esses impactos têm trazido para o ecossistema.

Unitermos: Cianobactérias, *Microcystis*, cianotoxina, microcistina, Ciprofloxacino, Clorexidina.

4.2. Introdução

A eutrofização dos corpos d'água, por resíduos domésticos, industriais e agrícolas, assim como as mudanças climáticas globais, desempenham papéis importantes na proliferação de cianobactérias (Figueiredo et al, 2004; Perga et al, 2013). Essa proliferação exacerbada, mais conhecida como floração, traz consequências importantes para os ecossistemas aquáticos, sendo considerada uma ameaça crescente para os corpos de água doce em todo o mundo (Perga et al, 2013, Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

Cianobactérias podem produzir uma variedade de metabólitos secundários, quimicamente diversos, com amplo espectro de aplicações, farmacêuticas e comerciais, tais como anti-inflamatórias, antibacterianas, inseticidas e herbicidas (Engene et al, 2013). Contudo, algumas espécies são produtoras de potentes toxinas, denominadas cianotoxinas (Moreira et al, 2014).

As cianotoxinas constituem um grupo de biomoléculas funcionalmente diverso como: peptídeos, alcaloides e lipopolissacarídeos. De acordo com suas células alvo em animais são classificadas como hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas), citotoxinas (cilindroespermopsinas), neurotoxinas (anatoxinas, saxitoxinas, β -metilamino-L-alanina (BMAA), e dermatotoxinas (lingbiatoxinas e aplisiatoxinas) (Moreira et al, 2014). As microcistinas são as toxinas mais comumente encontradas em florações produzidas por cianobactérias do gênero *Microcystis*. Acredita-se que cerca de 40 a 75% das linhagens de *Microcystis* produzam microcistinas (Corbel, Mougin e Bouaicha, 2014). Esse gênero é, comumente, dominante nos ecossistemas eutrofizados (Pantelic et al, 2013).

Atualmente, são conhecidas mais de 90 variantes de microcistinas, que diferem em relação aos radicais de aminoácidos na molécula nas posições X e Z (figura I), mas preservam os efeitos tóxicos. As microcistinas mais comuns são a MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-YR, no qual LR corresponde aos resíduos de aminoácidos leucina e arginina, e RR a dois resíduos de arginina (Cassini, Antunes e Keller, 2013). A microcistina LR (MC-LR) é considerada a de maior hepatotóxicidade (Rastogi, Madamwar, Incharoensakdi, 2015).

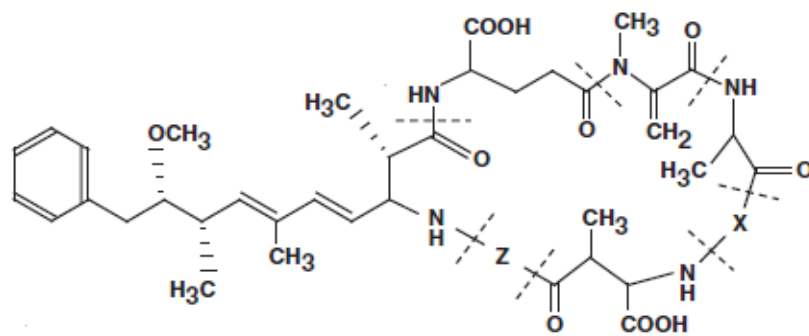


Figura I. Estrutura química da hepatotoxina Microcistina (MC). X e Z representam a posição dos aminoácidos variáveis
Fonte: Merel et al, 2013

As microcistinas hepatotóxicas são potentes inibidoras das fosfatases 1 (PP1), 2A (PP2A) e 3 (PP3), importantes enzimas reguladoras em vias metabólicas e respostas celulares em eucariotos. Essas toxinas apresentam capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células, de desorganizar o citoesqueleto, induzir a apoptose celular e causar danos ao DNA, o que pode estimular a proliferação de células cancerosas, sendo postulada a associação entre câncer hepático e consumo de águas contaminadas por cianotoxinas (Roegner e Puschner, 2014; Valério et al, 2014; Shi et al, 2015; Liu et al, 2016).

As microcistinas são persistentes em água, podendo ser encontradas por meses ou mesmo anos após sua liberação (Pantelic et al, 2013; Rastogi, Sinha, Incharoensakdi, 2014). A lise celular com a liberação maciça das cianotoxinas para o meio, normalmente, ocorre por exposição a substâncias químicas, principalmente algicidas, ou ao final de uma floração, onde as células estão em extremo estresse (Corbel, Mougin e Bouaicha, 2014; Fan et al, 2014; Wood, 2016). Os estímulos à produção dessas toxinas não são plenamente conhecidos, de modo que existe grande preocupação com a presença de substâncias no meio aquático que possam estimular a expressão ou a liberação das cianotoxinas.

Corpos d'água eutrofizados podem conter milhares de substâncias oriundas das atividades humanas e atualmente tem se tornado cada vez mais comum a presença de resíduos de fármacos. Há mais de 30 anos resíduos de antimicrobianos têm sido detectados em corpos d'água e, à medida que surgem tecnologias analíticas mais sofisticadas, os estudos apontam maior diversidade e quantidade desses fármacos e seus metabólitos no ambiente (Segura et al, 2009).

A contaminação dos corpos d'água por produtos farmacêuticos é decorrente, principalmente, do lançamento de efluentes domésticos e hospitalares sem o adequado tratamento. No Brasil, a avicultura e a pecuária também contribuem nesse processo que pode ocorrer indiretamente pela lixiviação de solos e aterros (Fatta-Kassinos, Meric e Nikolaou, 2011).

Alguns pesquisadores têm relatado que dentre os organismos aquáticos, as cianobactérias são as mais sensíveis aos resíduos de antimicrobianos (Holten-Lützhøft, Halling-Sørensen, Jørgensen, 1999; Halling-Sørensen et al, 2000). Devido a sua similaridade com bactérias gram-negativas, cianobactérias tornam-se alvo da ação dos bactericidas (Halling-Sorensen et al, 2000; Eguchi et al, 2004; Robinson, Belden, Lydy, 2005; Ando et al, 2007; Yang et al, 2009; Liu et al, 2012, 2012, 2014, 2015; Zhang et al, 2011; González-Pleiter et al, 2013; Zhou et al, 2013; Li, Geng e Yang, 2015, Liu et al, 2016). Por constituírem a base da cadeia trófica, os efeitos dos antimicrobianos sobre as cianobactérias podem levar ao desequilíbrio de todo o ecossistema aquático. Além dos danos diretos à comunidade aquática, Lin e colaboradores (2011) destacam o papel importante das cianobactérias na difusão de genes de resistência bacteriana.

A exposição de cianobactérias a produtos antimicrobianos pode estar associada à seleção de linhagens resistentes e as trocas gênicas entre microrganismos aquáticos podem favorecer o surgimento de patógenos resistentes, trazendo preocupação com o impacto disso na terapia de doenças infecciosas (Segura et al, 2009).

Outra preocupação com a exposição de cianobactérias a antimicrobianos é decorrente do risco de lise celular desses microrganismos com a liberação de cianotoxinas para o meio.

Dentre as muitas classes de fármacos identificadas no meio aquático destacam-se as fluoroquinolonas, que são os antimicrobianos mais frequentemente encontrados e em maior quantidade nas diversas matrizes ambientais (Rodrigues-Silva et al, 2014; Zhang, 2014). Biocidas compartilham a mesma propriedade bactericida e são extensivamente utilizados no ambiente hospitalar, suscitando estudos sobre a citotoxicidade desses produtos farmacêuticos sobre a integridade das cianobactérias e a produção e liberação de cianotoxinas.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito do antimicrobiano ciprofloxacino e do biocida clorexidina, sobre a produção e liberação de microcistinas (MC) por quatro linhagens de cianobactérias do gênero *Microcystis* (BA001, BA004, MIRF, NPJB).

4.3. Materiais e métodos

Linhagens de cianobactérias Quatro linhagens foram usadas nesse estudo. As linhagens BA004 (*Microcystis aeruginosa*) e BA001 (*Microcystis sp.*) foram isoladas no Parque Estadual do Rio Doce (PERD) – Minas Gerais (42°, 35', 595''; 19°, 46', 419'') e são mantidas no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) do Departamento de Biologia Geral / Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As linhagens de *Microcystis aeruginosa* MIRF e NPJB foram isoladas respectivamente do Reservatório do Funil – Resende / RJ e na Lagoa das Garças do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – São Paulo/SP, e mantidas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todas as linhagens foram mantidas no meio de cultura ASM-1 (Gorham et al, 1964).

Substâncias teste A formulação comercial de Cloridrato de Ciprofloxacino foi adquirida do laboratório Eurofarma®, 2mg/mL, 200 mL. O Digluconato de clorexidina foi adquirido do laboratório Sigma®, 20% em H₂O, 100 mL.

Monitoramento do crescimento das culturas O monitoramento do crescimento das culturas foi realizado por contagem celular, leitura da densidade óptica e avaliação quantitativa de clorofila-a.

A contagem celular foi feita em câmara de contagem de *Fuchs-Rosenthal*, com coloração com azul de tripan (500µL de solução azul de tripan 2% para um mL de cultura). Após sedimentação das células (10 minutos) fez-se a contagem em microscópio óptico.

A densidade óptica foi determinada em alíquotas de 3,0 mL de cultura, por espectrometria no visível (espectrofotômetro Aquamate® Plus UV-VIS) em comprimento de onda de 700nm.

A clorofila foi extraída por filtração à vácuo de alíquota da cultura (10 mL) em filtros de fibra de vidro (Macherel-Nagel® GF-1). Adicionou-se 5 mL de acetona (90%) aos filtros que foram macerados e centrifugados a 320.000 g, 20 minutos a 4 °C (Centrífuga Sigma® 4K15). As concentrações de clorofila-a foram determinadas a partir das leituras dos sobrenadantes nas absorvâncias 647 nm, 664 nm, 630 nm e 750 nm, e calculadas de acordo com a equação tricromática de Jeffrey & Humphrey (1975).

Quantificação de MC Para a quantificação de microcistinas foi utilizado o kit Beacon® (Inc., Portland, ME, USA) de Análise de Microcistinas Totais em placa de imunoafinidade – Kit ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), em leitor de microplacas (Multiscan FC – Thermo Scientific). Esse kit possui limite de quantificação (LQ) de 0,1 µg/L, e limite de detecção (LD) de 0,083 µg/L, controle negativo (0 µg/L de microcistina LR), padrão de microcistina-LR de 0,1 µg/L, 0,3 µg/L, 0,8 µg/L e 2,0 µg/L, e controle interno de microcistina de 1,0 µg/L. Metanol e Ácido Trifluoracético foram de grau de pureza PA. Os cartuchos de extração em fase sólida para purificação das microcistinas foram o *Strata-X® 33 µm Polymeric Reversed Phase, 200mg/6mL, Tubes, 30/Pk*.

Experimento de exposição às substâncias-teste As linhagens BA001 e BA004 foram pré-cultivadas em 600 mL e as MIRF-1 e NPJB-1 em 150 mL de meio de cultura ASM-1. Adicionou-se o inóculo de cultura, em fase logarítmica de crescimento, a cada frasco, em duplicata. Todos os frascos foram mantidos a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo 12h/12h, iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx e agitação.

Ao final do quarto dia deu-se início ao experimento com as substâncias teste. Foi separada uma alíquota de cada linhagem para a extração e quantificação de MC inicial, em condições basais (500 mL das linhagens BA001 e BA004, e 100 mL de MIRF e NPJB). Após homogeneização das culturas, todo o seu volume foi centrifugado, a 320.000 g/20 minutos a 15 °C e os *pellets* ressuspensos em novo meio ASM-1. Após reconstituição das culturas foi retirada uma alíquota para leitura da densidade óptica, clorofila e contagem celular. Foram adicionados às culturas teste uma solução de ciprofloxacino, recém-preparada, perfazendo ao final uma concentração de 0,015 mg/L. O mesmo procedimento foi utilizado para a série contendo clorexidina, com concentração final na cultura de 0,075 mg/L. As culturas teste e os controles foram mantidos nas mesmas condições do pré-cultivo, em duplicatas.

Após 96 horas, foi retirada uma alíquota do controle, e dos testes (Ciprofloxacino e Clorexidina) para leitura da densidade óptica (3 mL), clorofila (10 mL) e contagem celular (3 mL). Do restante das culturas foram separados 500 mL das linhagens BA001 e BA004 e 100 mL de MIRF-1 e NPJB-1, para determinação da concentração de microcistinas.

Extração de microcistina intracelular O processo de extração de microcistinas foi realizado de acordo com a Metodologia para quantificação de cianotoxinas (Azevedo e Magalhães, 2006). As culturas foram centrifugadas (320.000 g/20 minutos a 15 °C) e os *pellets* filtrados em filtros de fibra de vidro. Esses filtros foram previamente lavados com água ultrapura,

secos em estufa (100°C) e pesados. Após a filtração, os filtros foram novamente secos à 45°C por 1 hora e, após resfriamento, foram pesados. Calculou-se o peso seco das amostras pela diferença entre o peso final e o peso inicial do filtro.

Os filtros foram cortados manualmente e transferidos para um béquer, com 20 mL de metanol 75%, e deixados sob agitação por 1 hora. Esse extrato foi levado para rompimento das células e liberação do conteúdo intracelular, usando-se sonicador (Q55 QSonica®) por 20 min a 60 Hz de frequência. Posteriormente esse volume foi centrifugado, para separação dos resíduos dos filtros e sobrenadante.

Ao *pellet* foi adicionado mais 20 mL de metanol 75% para nova extração (agitação por 1h, sonicação por 10 min/60Hz), sendo esse processo repetido mais uma vez, em um total de 3 extrações com metanol 75%.

Os extratos foram reunidos e evaporados em evaporador rotatório a 45°C (MA120/TH Marconi®). O resíduo foi ressuspendido em 1,5 mL de água e submetido à purificação no cartucho Strata-X®.(33 μ m Polymeric Reversed Phase, 200mg/6mL, Tubes, 30/Pk). O cartucho foi ativado com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água. Após filtração de 1,5 mL de extrato, foram utilizados 10 mL de metanol 10%, 10 mL de metanol 20% e 10 mL de metanol 30% para lavagem do cartucho. Finalmente o cartucho foi eluído com 3 mL de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em metanol, coletando-se o eluato em um béquer, seguido da evaporação do solvente.

A amostra purificada foi ressuspendida em 1,5 mL de água, e feita a análise das microcistinas pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante.

Extração de microcistina extracelular Após centrifugação das culturas, todo o volume de sobrenadante foi extraído diretamente em cartucho Strata-X®. O volume extracelular teve que ser previamente filtrado à vácuo, com posterior adição de solução TFA 10% (10 mL por litro), seguido de nova filtração.

À essas amostras filtradas, adicionou-se metanol 100% (10mL/1L) e, após ativação de cartucho, seguiu-se o mesmo procedimento de extração.

Análise de MC por ELISA Após extração e purificação, as amostras foram analisadas por método de ELISA utilizando-se o kit Beacon®. Nos poços da placa revestida com anticorpos, foi pipetado 50 μ L de conjugado “microcistina-enzima”, posteriormente foram adicionados

50 µL de amostra seguidos por 50 µL de solução de anti-corpo. Após 30 minutos de repouso, os poços foram lavados com solução de lavagem e adicionaram-se 100 µL de substrato, deixando em repouso por 30 minutos. Após essa pausa foram adicionados 100 µL de solução de HCl 1N para interromper a reação. A placa foi levada ao leitor de microplacas Multiscan® FC e feita a leitura à 450 nm .

Análise estatística Para determinar diferença significativa na produção de MC entre controle e tratamentos, foi realizado o teste ANOVA unifatorial e teste de Tukey, para $p < 0,05$.

4.4. Resultados e discussão

Os produtos farmacêuticos selecionados para o estudo, ciprofloxacino e clorexidina, apresentam propriedades diferentes quanto ao uso clínico e aos mecanismos de ação. Buscou-se assim verificar se alterações na produção de toxinas apresentavam perfil relacionado ao modo de ação do produto antimicrobiano.

Do mesmo modo, procurou-se trabalhar com linhagens com diferenças na expressão da microcistina de forma a avaliar se nos dois grupos havia variação dos comportamentos frente às substâncias teste.

As linhagens de cianobactérias, isoladas do PERD, utilizadas nesse estudo foram previamente avaliadas por sequenciamento genético e foi identificado o grupo de genes que codifica a expressão de microcistina. Foi realizado também o ensaio de ELISA, que mostrou fraca produção de MC. As linhagens MIRF e NPJB, cedidas pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, foram caracterizadas como grandes produtoras de MC em condições naturais.

Para a realização dos testes decidiu-se trabalhar com uma única concentração, uma vez que essa seria mais próxima da condição de exposição no ambiente. As concentrações foram estabelecidas a partir de dados da literatura e de estudos prévios indicando que para diferentes linhagens de *M. aeruginosa* a EC_{50} média era de 0.015 mg/L de ciprofloxacina e maior que 0.1 mg/L para a clorexidina (Robinson et al, 2005; Halling-Sorensen et al, 2000; Lawrence et al, 2008). Assim, as concentrações testadas foram 0.075 mg/L para a clorexidina e 0.015mg/L para a ciprofloxacina. Às culturas das quatro linhagens das cianobactérias do gênero *Microcystis* (BA001, BA004, MIRF, NPJB) foram adicionados de solução de ciprofloxacino e clorexidina separadamente, obtendo-se as concentrações teste no meio de cultura.

Nessas condições avaliou-se o efeito da clorexidina e da ciprofloxacino sobre o crescimento das linhagens de *Microcystis*. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de inibição de crescimento das linhagens de *Microcystis* expostas ao Ciprofloxacino ou a Clorexidina, após 96 horas de contato.

	BA004	BA001	MIRF	NPJB
Ciprofloxacino (0,015 mg/L)	28,2%	64,1%	19,0%	22,5%
Clorexidina (0,075 mg/L)	29,3%	26,5%	3,5%	7,5%

Destaca-se que, ao definir-se a concentração das substâncias teste, visava-se trabalhar no limite de tolerância das espécies, promovendo um estresse máximo para verificar se nessa condição observavam-se efeitos sobre a produção de toxinas pelas diferentes linhagens. Contudo, as diferenças no comportamento das linhagens levou a grande variação das taxas de inibição de crescimento.

Pode-se observar na tabela 1 que, frente à mesma concentração das substâncias teste, as linhagens apresentaram diferentes respostas em termos de crescimento. As linhagens BA001 e BA004 se mostraram mais sensíveis, com inibição de crescimento maior que as outras duas linhagens, sendo que para a BA001 a inibição de crescimento pelo ciprofloxacino foi maior que 60%. Essa sensibilidade foi observada frente à clorexidina, em menor escala, mesmo sendo os mecanismos de ação destas totalmente diferentes. Embora sejam linhagens de mesmo gênero e três da mesma espécie, compartilhando as mesmas características fisiomorfológicas, essas linhagens se diferenciaram consideravelmente com relação à resistência as substâncias com atividade antimicrobiana.

Uma possível explicação para essa diferença de sensibilidade aos xenobióticos pode se dever a origem das linhagens. Enquanto a BA001 e BA004 foram isoladas de um parque de conservação com baixo impacto de poluentes, MIRF e NPJB foram isoladas de áreas mais eutrofizadas, estando naturalmente sujeitas à pressão seletiva quando expostas a um agente tóxico que afete seu metabolismo (Kummerer, 2009). Locais fortemente impactados tendem a selecionar linhagens celulares com resistência cruzada a múltiplos poluentes (Moraes, 2005).

Como cianobactérias tem grande similaridade morfológica, bioquímica e gênica com bactérias gram-negativas, bactérias resistentes a agentes antimicrobianos podem, por meio de troca de material genético, adquirir maior resistência a eles. Além disso, a clorexidina assemelha-se a outros agentes de uso habitual como os sais de amônio quaternário (Bonez et

al, 2013; Cassir, 2015), frequentes no meio aquático impactados, o que pode afetar o processo de seleção de cepas resistentes a esse biocida.

Além da inibição de crescimento, outras ações sobre o metabolismo de como a produção de pigmentos podem sinalizar toxicidade para as espécies. A clorofila-a tem sido usada há décadas para explicar a organização e funcionamento, assim como a adaptação do sistema fotossintético das células autotróficas (Porcar-Castell et al, 2014). Os métodos de análise de clorofila-a são simples e indicativos de interferência no processo fotossintético, trazendo importantes informações sobre os efeitos dos xenobióticos a esses organismos (Magalhães et al, 2013).

Como as taxas de inibição de crescimento das linhagens, variaram de 3,5 a 64,5% os dados de produção de clorofila foram convertidos em produção por unidade funcional, ou seja, concentração de clorofila/célula, como uma forma mais confiável de se analisar o efeito das substâncias-teste sobre as culturas. Analisando-se esses dados após 96 horas de cultivo, observamos que não há um comportamento sistemático entre as linhagens. A BA001 (figura II.b) e MIRF (figura II.c), sob ação de 0,015 mg/L de ciprofloxacino, apresentaram aumento superior a 30% de produção de clorofila, comparadas com seus respectivos controles. As outras linhagens (BA004 e NPJB) não mostraram diferenças significativas na produção de clorofila-a, em relação aos controles (figura II.a e d).

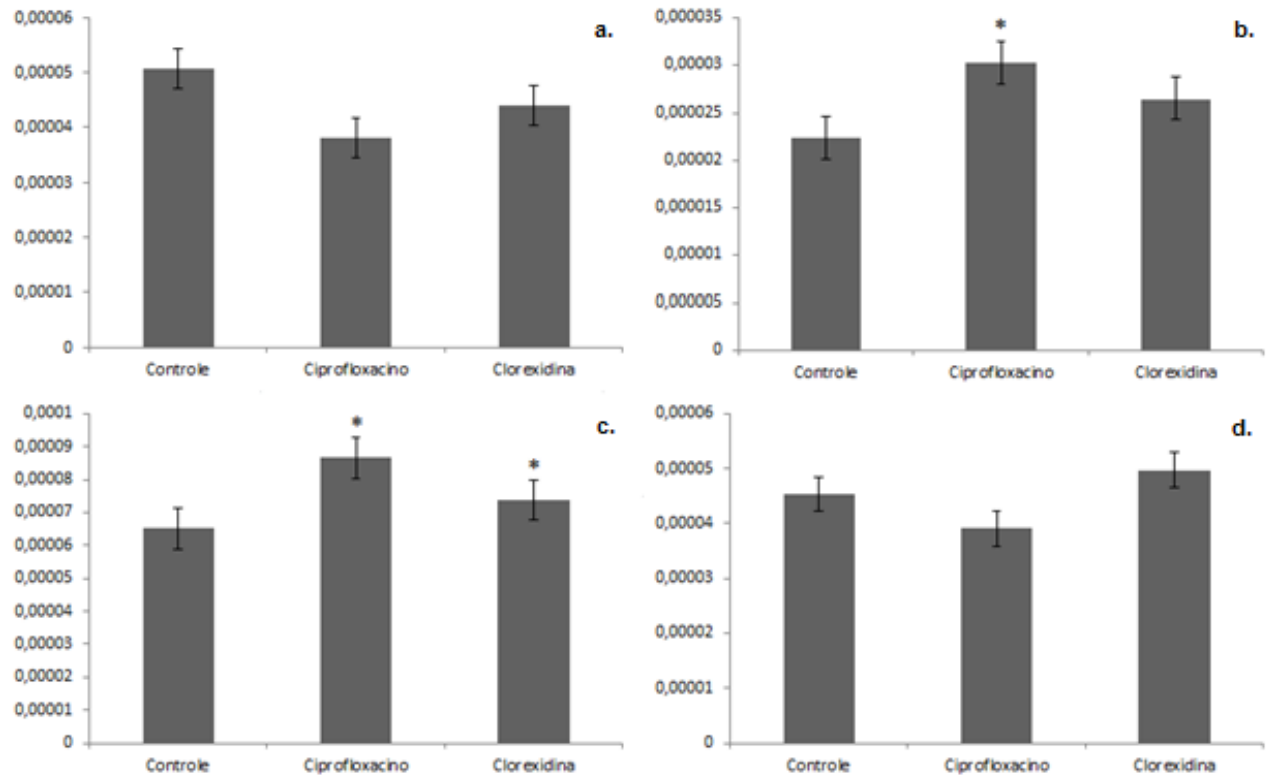


Figura II. Produção de clorofila-a por célula (µg/célula) pelas linhagens de *Microcystis*: a. BA004; b. BA001; c. MIRF; d. NPJB; sob efeito de 0,015 mg/L de ciprofloxacino e 0,075 mg/L de clorexidina, após 96 horas de exposição. O asterisco (*) indica diferença significativa na produção de clorofila dos testes contra seus respectivos controles, aceitando um nível de significância de 0,05 ($P < 0,05$).

Aparentemente, para algumas linhagens ocorre estímulo da produção de clorofila com a exposição tanto aos produtos antimicrobianos, quanto biocidas, independente do mecanismo de ação destes. Dados semelhantes foram relatados por Wan, Guo e Zhang (2014) e Deng, Pan e Zhang (2015), que testaram diferentes concentrações de antimicrobianos da classe das quinolonas em espécies do gênero *Microcystis*. Os autores concluíram que baixas concentrações de antimicrobianos (0,1 mg/L) podem intensificar o processo fotossintético, porém altas concentrações inibem a síntese de clorofila e de carotenoides. Contudo, não há consenso entre pesquisadores, uma vez que em outros estudos foi observada a inibição de crescimento frente a qualquer dose de exposição à substâncias com atividade antimicrobiana (Richards et al, 2004; Qian et al, 2012; Pan et al, 2009; Liu et al, 2011).

Deng, Pan e Zhang (2015) relatam que o anel quinolônico e o grupo amino secundário das fluoroquinolonas podem agir como inibidores de um sistema chave de transporte de elétrons na fotossíntese - PS-II (*photosystem II*) (Aristilde, Melis e Sposito, 2009; Deng, Pan e

Zhang, 2015). Ciprofloxacino, especificamente, interfere na transferência de energia proveniente da excitação das moléculas no centro de reação do fotossistema-II. Porém, sugere-se que essa interferência só ocorra frente à altas concentrações do antimicrobiano (concentrações próximas de 10 mg/L) e que o estímulo à síntese de clorofila causado por ciprofloxacino seja apenas uma reação de dissipação de excesso de energia, para evitar maiores danos à célula (Deng, Pan e Zhang, 2015). Não há dados disponíveis para a clorexidina.

As MC são peptídeos sintetizados por via não-ribossomal, e são encontradas por todo o interior da célula, porém alguns autores sugerem que elas podem estar localizadas em maior quantidade nos nucleoplasmas e corpos de pirofosfato, e a maior parte delas nos tilacóides (Young et al, 2005) onde é sintetizada a clorofila.

Campos e Vasconcelos (2010) e Liu e colaboradores (2016) sugerem a participação das MC no processo de captação e resposta à luz pelas clorofilas durante a fotossíntese, com interação direta entre a enzima sintetizadora de microcistina, a sintetase da microcistina (mcyb), e enzimas do sistema PSII, PSI e pigmentos fotossintéticos, responsáveis pela fotossíntese (Campos e Vasconcelos, 2010; Liu et al, 2016). Essa associação direta entre síntese de clorofila e produção de microcistinas não foi sistematicamente observada nesse trabalho (ver dados abaixo), com comportamento variável entre as linhagens.

Efeito do antimicrobiano e do biocida na produção de MC A concentração de microcistinas foi avaliada por análise imunoenzimática e, embora esse método seja muito sensível para a detecção de MC, ele tem como limitação a não diferenciação entre suas variantes, detectando apenas equivalentes de microcistina total.

Foram preparados os extratos intra e extracelulares das culturas, os quais foram purificados e submetidos ao teste de ELISA. As concentrações de MC foram corrigidas pelo número de células, já que esse número variou entre as linhagens, permitindo as comparações. Os resultados são apresentados na Tabela 3 e Figura III.

Tabela 2. Conteúdo de microcistinas total, intracelular e extracelular, expostas ao ciprofloxacino (0,015 mg/L) e clorexidina (0,075 mg/L) das linhagens de *Microcystis* BA004, BA001, MIRF e NPJB, após 96 horas.

BA004			
	Controle	Ciprofloxacino	Clorexidina
MC Total (10^{-7} ppb) (n=2)	1,420 ± 0,069	2,943 ± 0,147	1,073 ± 0,019
MC Extracelular (10^{-7} ppb) (n=2)	0,904 ± 0,088	2,065 ± 0,129	0,549 ± 0,043
MC Intracelular (10^{-7} ppb) (n=2)	0,516 ± 0,019	0,878 ± 0,017	0,524 ± 0,024
BA001			
	Controle	Ciprofloxacino	Clorexidina
MC Total (10^{-7} ppb) (n=2)	3,527 ± 0,109	3,730 ± 0,170	2,293 ± 0,215
MC Extracelular (10^{-7} ppb) (n=2)	1,547 ± 0,098	1,114 ± 0,194	1,416 ± 0,060
MC Intracelular (10^{-7} ppb) (n=2)	1,981 ± 0,010	2,616 ± 0,023	0,877 ± 0,155
MIRF			
	Controle	Ciprofloxacino	Clorexidina
MC Total (10^{-3} ppb) (n=2)	3,014 ± 0,072	4,264 ± 0,198	3,892 ± 0,015
MC Extracelular (10^{-3} ppb) (n=2)	0,263 ± 0,004	0,231 ± 0,019	0,897 ± 0,006
MC Intracelular (10^{-3} ppb) (n=2)	2,751 ± 0,068	4,033 ± 0,179	2,994 ± 0,021
NPJB			
	Controle	Ciprofloxacino	Clorexidina
MC Total (10^{-3} ppb) (n=2)	1,061 ± 0,042	1,341 ± 0,044	1,366 ± 0,017
MC Extracelular (10^{-3} ppb) (n=2)	0,009 ± 0,0006	0,012 ± 0,002	0,010 ± 0,001
MC Intracelular (10^{-3} ppb) (n=2)	1,052 ± 0,042	1,329 ± 0,042	1,355 ± 0,018

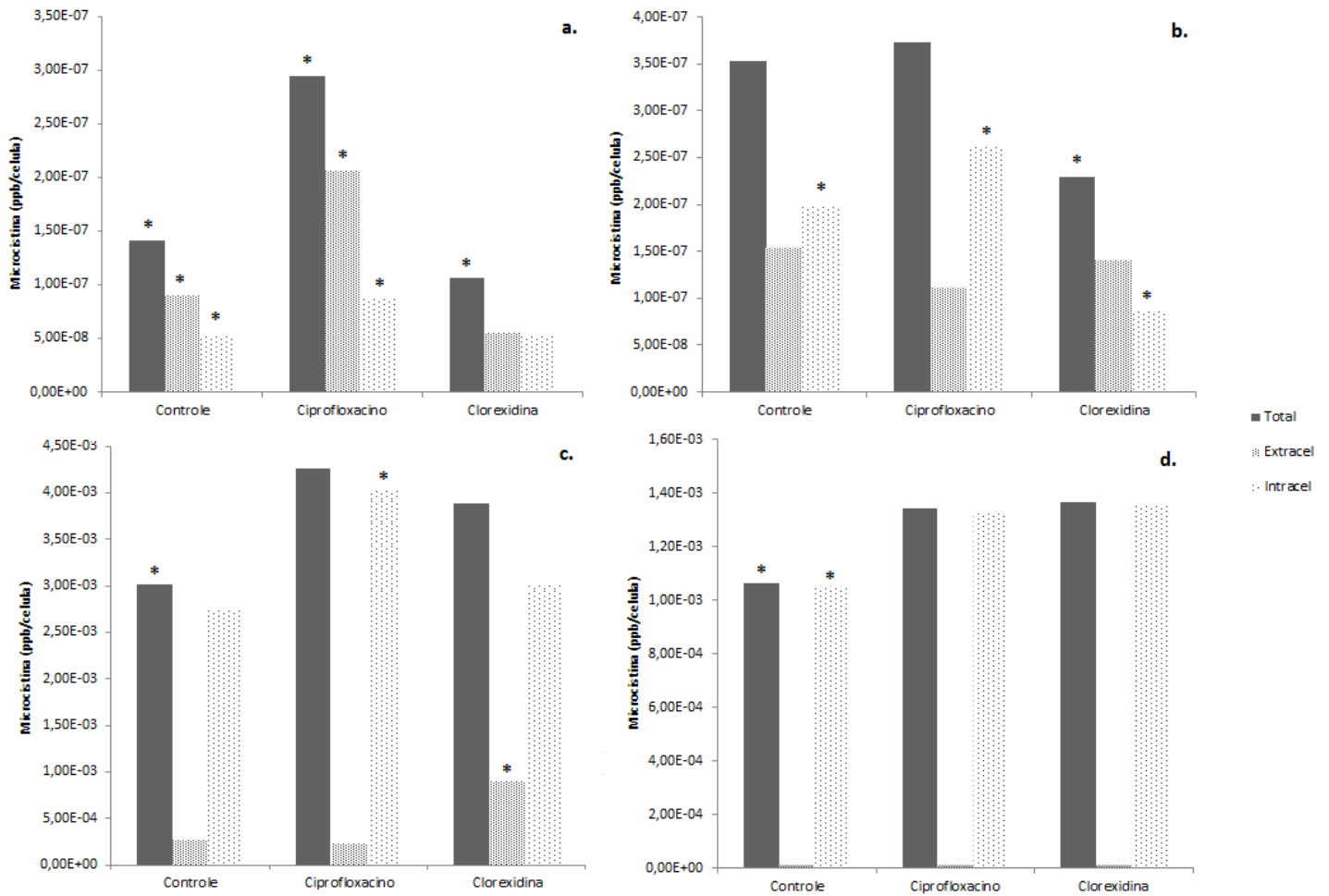


Figura III. Produção de microcistina total, intracelular e extracelular por célula (ppb/célula) pelas linhagens de *Microcystis*: a. BA004; b. BA001; c. MIRF; d. NPJB; controle, teste com ciprofloxacino (0,015 mg/L) e teste com clorexidina (0,075 mg/L), após 96 horas de exposição. Método de ELISA. O asterisco (*) indica diferença significativa entre controles e testes (P < 0,05).

Considerando a MC total (intracelular e extracelular), observamos no geral, aumento na concentração dessa toxina, nas culturas expostas às substâncias teste. As linhagens MIRF, NPJB e BA004 mostraram aumento na concentração de MC total frente à ciprofloxacino e à clorexidina, comparadas aos seus controles. Já sob efeito de clorexidina, houve aumento na concentração total de MC para as linhagens MIRF e NPJB (figura III; tabela 3).

Ainda na tabela 3, observam-se diferenças nas concentrações intracelulares e extracelulares de microcistinas, entre testes e controles. Verifica-se que as linhagens BA001, MIRF e NPJB apresentaram aumento na produção de microcistina intracelular quando expostas ao ciprofloxacino. Com relação à clorexidina, apenas a linhagem NPJB mostrou maior concentração intracelular da toxina, comparada ao seu controle.

Destaca-se que as linhagens MIRF e NPJB mostraram-se menos sensíveis às substâncias teste, com menor inibição de crescimento, portanto sujeitas a um menor nível de estresse.

Os resultados apontaram diferenças significativas no comportamento entre as linhagens. As linhagens MIRF e NPJB apresentaram, considerando as diluições, concentração cerca de 10.000 vezes maiores de MC, comparado às linhagens selvagens. Nas condições do teste as culturas são submetidas a condições de estresse e, as interações proteína-proteína induzidas pelas microcistinas têm sido relacionadas à capacidade das MC de responderem ao estresse ambiental. Liu e colaboradores (2016) e Babica e colaboradores (2006) descrevem uma interação entre as enzimas sintetizadoras das microcistinas (*mcy*) com “enzimas universais de *stress*”, mediadas por proteínas relacionadas com a fotossíntese, como uma forma de defesa (Babica et al, 2006; Liu et al, 2016), evidenciando o papel da produção de microcistinas como resposta ao estresse causado por substâncias presentes no meio externo.

Previamente à este estudo, foi realizada análise molecular das linhagens BA004 e BA001, identificando-se o grupo de genes responsável pela codificação da enzima *mcy* (Genuário et al, 2010; Gehringer e Wannicke, 2014). Porém, apesar da presença desses genes, observamos que eles pouco se expressam, mesmo em condições de estresse frente aos produtos antimicrobianos testados. Essas linhagens, coletadas em um ambiente não poluído, podem não ter se aclimatado as condições ambientais adversas que poderiam, supostamente, estimular a expressão de mecanismos de proteção.

As MC são sintetizadas e armazenadas dentro das células, mas sua liberação para o meio externo é majoritariamente causada por danos à membrana por agentes externos ou por morte celular (Liu et al, 2016). A liberação também, em menor proporção, pode ocorrer via proteínas de efluxo pela membrana externa. Como o mecanismo de efluxo é limitado pelas proteínas transportadoras, portanto sujeito a saturação, a maior presença de MC extracelulares nas linhagens coletadas de ambiente não poluído expostas a clorexidina, é compatível com o mecanismo de ruptura celular, próprio desse biocida.

Não se pode afirmar que o fato de duas das linhagens serem expressivas produtoras de toxinas seja determinante de seu comportamento frente aos antimicrobianos, porém essa é uma das hipóteses, ou seja, elas responderiam de forma mais efetiva ao estímulo. Porém as diferenças no estresse desencadeado pela concentração da substância teste no meio e a taxa de inibição de crescimento da linhagem, limitam essa conclusão. Isso já foi sugerido por outros

trabalhos, os quais consideraram que cepas produtoras de toxina são capazes de resistir à condições de estresse e de aumentar a produção de toxina sob essas condições (Zilliges et al, 2011; Kurmayer, 2011).

Apesar dos fatores determinantes e dos mecanismos de ativação do aumento da produção de MC ainda não estarem bem elucidados (Gehring e Wannicke, 2014), admite-se que no ambiente natural alguns contaminantes químicos possam agir como agentes estimuladores da produção alelopática como forma de sobrevivência da espécie em risco.

A alelopátia é uma propriedade descrita para vegetais, porém comum aos organismos fito planctônicos e bactérias, e se dá pelo estímulo a produção de metabólitos secundários quando submetidos a processos de competição por nutrientes ou a herbivoria (Legrand et al, 2003; Brutemark et al, 2015). As substâncias teste, com propriedades antimicrobianas, podem sinalizar para as cianobactérias o risco iminente de dano e estimular a produção dos metabólitos tóxicos.

4.5. Conclusão

O estudo realizado permitiu verificar que linhagens de um mesmo grupo de cianobactérias produtoras de toxinas podem apresentar comportamentos distintos no que se refere a expressão de cianotoxinas, quando expostas a produtos com atividade antimicrobiana. Linhagens de *Microcystis* provenientes de locais pouco impactados demonstraram maior sensibilidade em termos de inibição de crescimento frente aos produtos antimicrobianos testados.

A presença de resíduos de substâncias antimicrobianas no meio aquático, entre os muitos transtornos possíveis, pode exercer pressão seletiva sobre os organismos fitoplanctônicos selecionando linhagens mais resistentes a esses poluentes.

Observou-se também a maior síntese e armazenamento de microcistinas intracelularmente quando expostas ao ciprofloxacino. Uma hipótese é que esse antimicrobiano possa interagir com as células, estimulando de forma mais efetiva a produção de metabólitos secundários.

Nesse trabalho verificou-se que o ciprofloxacino e a clorexidina, podem atuar sobre as linhagens de *Microcystis*, alterando a dinâmica de crescimento da linhagem, a produção de

clorofila e de microcistinas. Possivelmente as duas substâncias teste avaliadas, por apresentarem atividade antimicrobiana por diferentes mecanismos, alteraram o perfil de produção de toxinas de forma diferenciada, principalmente com relação à liberação da toxina para o meio extracelular, não permitindo a extrapolação do comportamento desses organismos frente a outros antimicrobianos.

Os resultados apontam para a gravidade do lançamento de efluentes contendo resíduos de medicamentos nos corpos d'água, os quais oferecem risco direto à biota aquática e indireto à população humana. Conforme demonstrado, cianobactérias podem sofrer danos às estruturas celulares que resultam em alterações metabólicas podendo se refletir na contaminação da água e comprometer a saúde humana.

4.6. Agradecimentos

Agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica e Laboratório de Análise de Água, da Faculdade de Farmácia, e do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, dos quais proporcionaram a realização deste trabalho, e também ao Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que nos deu o suporte para a realização deste trabalho.

4.7. Referências

- ANDO T, NAGASE H, EGUCHI K, HIROOKA T, NAKAMURA T, MIYAMOTO K, HIRATA K.. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agentes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Osaka, v.26, n.4, p.601–606, 2007.
- ARISTILDE L, MELIS A, SPOSITO G. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environmental Science Technology*, Berkeley, v.44, p.1444–1450, 2010.
- AZEVEDO S.M.F.O., MAGALHÃES V.F. Metodologia para quantificação de cianotoxinas. In: *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. Belo Horizonte: ProSab, 2006. p.467-503..
- BABICA P, BLÁHA L, MARSALEK B. Exploring the natural role of microcystins – A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*, v.42, p.9–20, 2006.
- BONEZ PC, DOS SANTOS ALVES CF, DALMOLIN TV, AGERTT VA, MIZDAL CR, FLORES VDA C, MARQUES JB, SANTOS RC, ANRAKU DE CAMPOS MM. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*. Santa Maria, v. 41, p. e119-e122, 2013.
- BRUTEMARK A, VANDELANNOOTE A, ENGSTRÖMÖST J, SUIKKANEN S. A less saline baltic sea promotes cyanobacterial growth, hampers intracellular microcystin production, and leads to strain-specific differences in allelopathy. *PLoS ONE*, Ekenäs, v.10, n.6, e0128904. doi:10.1371/journal.pone.0128904, 2015.
- CAMPOS A, VASCONCELOS V. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, Porto, v.11, p.268-287, 2010.
- CASSINI S, ANTUNES P, KELLER R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, Vitória, v. 36, n. 8, p.1208-1213, 2013.
- CASSIR N, THOMAS G., HRAIECH S., BRUNET J., FOURNIER PE., LA SCOLA B., PAPAIZIAN L. Chlorhexidine daily bathing: Impact on health care -associated infections caused by gram-negative bacteria. *American Journal of Infection Control xxx*, Marseille, p. 1-4, 2015.
- CORBEL S, MOUGIN C, BOUAICHA N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, Versailles, v. 96, p. 1–15, 2014.
- DENG C, PAN X, ZHANG D. Influence of ofloxacin on photosystems I and II activities of *Microcystis aeruginosa* and the potential role of cyclic electron flow. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Kunming, v.119, n.2, p.159-164, 2015.
- EGUCHI K, NAGASE H, OZAWA M, ENDOH YS, GOTO K, HIRATA K, MIYAMOTO K, YOSHIMURA H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, Tokyo, v.57, p.1733–1738, 2004.
- ENGINE N, GUNASEKERA SP, GERWICK WH, PAUL VJ. Phylogenetic inferences reveal a large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. San Diego, v.79, n.6, p.1882–1888, 2013.
- FAN J, HOBSON P, HO L, DALY R, BROOKES J. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, Adelaide, v. 264, p. 313– 322, 2014.
- FATTA-KASSINOS D, MERIC S, NIKOLAOU A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*, Cyprus, v. 399, p.251–275, 2011.
- FIGUEIREDO DR, AZEITEIRO UM, ESTEVES SM, GONÇALVES FJ, PEREIRA MJ. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Aveiro, v. 59, p. 151–163, 2004.

- GEHRINGER M, WANNICKE N. Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, Kaiserslautern, v.88, p.1–25, 2014.
- GENUÁRIO D, SILVA-STENICO ME, WELKER M, MORAES LA, FIORE M. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc. Toxicon*, Piracicaba, v.55, p.846–854, 2010.
- GONZALEZ-PLEITER M, GONZALO S, RODEA-PALOMARES I, LEGANÉS F, ROSAL R, BOLTES K, MARCO E, FERNÁNDEZ-PIÑAS F. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, Madrid, v.47, p.2050-2064, 2013.
- GORHAM, P.R, J MCLACHLAN, UT HAMMER, WK KIM. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. v. 15, p.796-804, 1964.
- HALLING-SØRENSEN B, LÜTZHØFT HC, ANDERSEN HR, INGERSLEV F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Copenhagen. v. 46, n. 1, p. 53–58, 2000.
- HOLTEN-LÜTZHØFT, H.C., HALLING-SØRENSEN, B., JØRGENSEN, S.E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*. Copenhagen, v. 36, p. 1–6, 1999.
- JEFFREY SW, HUMPHREY GF. New espectrofotometric equations for determining chlorophylls a,b, c and c2 in higher plants, algal and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*. Bd.167, p. 191-194, 1975.
- KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, Freiburg, v.75, p.417–434, 2009.
- KURMAYER R. The toxic cyanobacterium *Nostoc sp.* Strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of Phycology*. Mondsee, v.47, p.200–207, 2011.
- LAWRENCE J, ZHU B, SWERHONE GD, TOPP E, ROY J, WASSENAAR LI, REMA T, KORBER DR. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Applied And Environmental Microbiology*, Saskatchewan, v.74, n.11, p. 3541–3550, 2008.
- LEGRAND C., RENGEFORS K, FISTAROL GO, GRANÉLI E. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. v.42, n.4, p.406-419, 2003.
- LI Z, GENG M, YANG H. Algicidal activity of *Bacillus sp.* Lzh-5 and its algicidal compounds against *Microcystis aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*, Shanghai, v.99, p.981–990, 2015.
- LIN S, HAAS S, ZEMOJTEL T, XIAO P, VINGRON M, LI R.. Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. *Gene*, v. 473, p. 139–149, 2011.
- LIU Y, GUAN Y, GAO B, YUE Q. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Jinan, v.86, p.23–30, 2012.
- LIU Y, GAO B, YUE Q, GUAN Y, WANG Y, HUANG L. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Jinan, v.77, p.79–87, 2012.
- LIU Y, ZHANG J, GAO B, FENG S. Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, Jinan, v.279, p.148–155, 2014.
- LIU Y, WANG F, CHEN X, ZHANG J, GAO B. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Jinan. v. 111, p. 138–145, 2015.
- LIU Y, CHEN S, ZHANG J, GAO B. Growth, microcystin-production and proteomic responses of *Microcystis aeruginosa* under long-term exposure to amoxicillin. *Water Research*, Jinan, v.93, p.141–152, 2016.

- MAGALHÃES SMS, BRÊTAS CM, BRÊTAS JM, PIANETT GA, FRANCO MW, BARBOSA FAR. Toxic concentrations of metronidazole to *Microcystis protocystis*. *Brazilian Journal of Biology*, Belo Horizonte, v.74, n.3, p.120-124, 2014.
- MEREL S, WALKER D, CHICANA R, SNYDER S, BAURÈS E, THOMAS O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, Tucson, v.59, p.303–327, 2013.
- MORAIS, E. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas. 2005. 73 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Geociências e Meio Ambiente – Mestrado e Doutorado) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- MOREIRA C. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Porto, v.98, p.8073–8082, 2014.
- PAN X, ZHANG D, CHEN X, MU G, LI L, BAO A. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis* sp. *Chemosphere*, Urumqi, v.77, p.413–418, 2009.
- PANTELIC D, SVIRČEV Z, SIMEUNOVIĆ J, VIDOVIĆ M, TRAJKOVIĆ I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*, Novi Sad, v. 91, p. 421-441, 2013.
- PERGA ME, DOMAIZON I, GUILLARD J, HAMELET V, ANNEVILLE O. Are cyanobacterial blooms trophic dead ends? *Oecologia*, Thonon, v.172, p.551–562, 2013.
- PORCAR-CASTELL A, TYYSTJÄRVI E, ATHERTON J, VAN DER TOL C, FLEXAS J, PFÜNDEL EE, MORENO J, FRANKENBERG C, BERRY JA. Linking chlorophyll *a* fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. *Journal of Experimental Botany*, Helsinki, v.65, n.15, p. 4065–4095, 2014.
- QIAN H, LI J, PAN X, SUN Z, YE C, JIN G, FU Z. Effects of Streptomycin on Growth of Algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Toxicology*, Hangzhou, p.229-237, 2010.
- RASTOGI RP, MADAMWAR D, INCHAROENSAKDI A. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, Bangkok, v. 6 n. 1254, p. 1-22, 2015.
- RASTOGI RP, SINHA RP, INCHAROENSAKDI A. The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Rev Environ Sci Biotechnol*, Bangkok, v. 13, p. 215–249, 2014.
- RICHARDS SM, WILSON CJ, JOHNSON DJ, CASTLE DM, LAM M, MABURY SA, SIBLEY PK, SOLOMON KR. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environmental toxicology and chemistry*, Tennessee, v.23, n.4, p.1035–1042, 2004.
- ROBINSON AA, BELDEN JB, LYDY MJ. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Carbondale, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.
- RODRIGUES-SILVA C, MANIERO M, PERES M, GUIMARÃES JR. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. *Quim. Nova*, Campinas, v.37, n.5, p.868-885, 2014.
- ROEGNER AF, PUSCHNER B. Aggregate culture: A more accurate predictor of microcystin toxicity for risk assessment. *Toxicon*, v.83, p.1–14, 2014.
- SEGURA PA, FRANÇOIS M, GAGNON C, SAUVÉ S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental Health Perspectives*, v.117, n.5, p. 675, 2009.
- SHI Y, JIANG J, SHAN Z, BU Y, DENG Z, CHENG Y. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology*, Nanjing, v.24, p.511–519, 2015.
- VALÉRIO E, VILARES A, CAMPOS A, PEREIRA P, VASCONCELOS V. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon*, Lisboa, v.90, p.191-198, 2014.

- WAN J, GUO P, ZHANG S. Response of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* to levofloxacin. *Environmental Science and Pollution Research*, Huaqiao, v.21, n.5, p.3858-3865, 2014.
- WOOD R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. *Environment International*. Perth. v. 91, p. 276–282, 2016.
- YANG JD, HU LB, ZHOU W, YIN YF, CHEN J, SHI ZQ. Lysis of *Microcystis aeruginosa* with Extracts from Chinese Medicinal Herbs. *International Journal of Molecular Sciences*, Nanjing, v.10, p.4157-4167, 2009.
- YOUNG FM, THOMSON C, METCALF JS, LUCOCQ JM, CODD GA. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology*, Dundee, v.151, n.2, p.208-14, 2005.
- ZILLIGES Y, KEHR JC, MEISSNER S, ISHIDA K, MIKKAT S, HAGEMANN M, KAPLAN A, BEORNER T, DITTMANN E. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *Phycologia*. v.42, n.4, p.406-419, 2011.
- ZHANG H, YU Z, HUANG Q, XIAO X, WANG X, ZHANG F, WANG X, LIU Y, HU C. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologica*, Anhui, v.41, p.70–77, 2011.
- ZHANG Q, JIA A, WAN Y, LIU H, WANG K, PENG H, DONG Z, HU J. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol*, Beijing, v.48, p.14317–14325, 2014.
- ZHOU S, SHAO Y, GAO N, DENG Y, QIAO J, OU H, DENG J. Effects of different algaecides on the photosynthetic capacity, cell integrity and microcystin-LR release of *Microcystis aeruginosa*. *Science of the Total Environment*, Shanghai, v. 463–464, p. 111–119, 2013.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o delineamento dessa dissertação partiu-se da hipótese de que substâncias com atividade antimicrobiana podem interagir com células de cianobactérias no meio aquático afetando a produção e a liberação de cianotoxinas.

Selecionaram-se para o estudo duas cianobactérias isoladas do Parque Estadual do Rio Doce, previamente identificadas como produtoras de microcistina: *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*. As substâncias teste foram o antimicrobiano Cloridrato de Ciprofloxacina e o biocida Digluconato de Clorexidina.

Os experimentos foram divididos em duas partes, conforme os objetivos específicos:

- Efeitos da clorexidina e do ciprofloxacino sobre o crescimento das linhagens de cianobactérias (Primeiro artigo apresentado neste manuscrito submetido à revista *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, aguardando avaliação e parecer).
- Avaliação da expressão e liberação de microcistinas pelas linhagens de *Microcystis* expostas ao ciprofloxacino e à clorexidina (Segundo artigo - Aguardando alguns resultados para submissão)

A primeira parte (artigo I) objetivou a determinação da EC_{50} , necessária para definição da concentração de trabalho para os experimentos de expressão e liberação de toxinas pelas cianobactérias expostas às substâncias teste. Os testes de inibição de crescimento para as cianobactérias permitiram observar as alterações no comportamento desses organismos frente às substâncias teste, como produção de clorofila, redução e recuperação do crescimento frente às substâncias com atividade antimicrobiana, além das diferenças observadas entre as linhagens.

Esse primeiro capítulo teve como principal contribuição a demonstração da sensibilidade das linhagens estudadas às substâncias teste. As EC_{50} obtidas, de modo geral são iguais ou inferiores às concentrações inibitórias mínimas para patógenos humanos, no caso do ciprofloxacino (Andrews, 2001). Verificou-se que estas linhagens, em meio de cultura, comportam-se de forma similar aos patógenos no que se refere à resposta aos agentes com atividade antimicrobiana: fármacos bactericidas como a ciprofloxacina levam a um efeito pronunciado e persistente de redução de crescimento e o biocida clorexidina, de amplo uso hospitalar, levou a um rápido efeito de redução de crescimento, com posterior recuperação, mesmo frente às quantidades residuais do xenobiótico na cultura. Embora não tenha sido esse

o escopo desse trabalho, extrapolando-se para outros ambientes esse resultado pode sugerir que, entre patógenos humanos, haja processo semelhante, o que representa um risco, pois sugere rápida seleção de microrganismos resistentes.

Na segunda parte do estudo, foram necessários alguns ajustes no delineamento experimental inicial. As linhagens isoladas do PERD, utilizadas para os experimentos, se mostraram fracas produtoras de cianotoxinas, embora possuam os genes que codificam a expressão desse metabólito secundário. Esse era um fator limitante devido à sensibilidade dos métodos de detecção de microcistinas. Por meio de colaboração estabelecida com a Profa. Sandra Azevedo (LETC/UFRJ) foi fornecida duas novas linhagens de *M. aeruginosa* (MIRF e NPJB), altamente produtoras de toxinas, para um melhor controle dos experimentos.

Utilizou para os testes de produção de toxinas valores de concentração próximos à EC_{50} encontradas para linhagens de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis panniformis*, que se assemelharam a outras descritas na literatura. Considerou-se que essas concentrações representavam um valor médio capaz de levar a estresse todas as quatro linhagens. Os testes para determinação da EC_{50} dessas duas novas linhagens não foram realizados em função da indisponibilidade de tempo, porém os resultados de inibição de crescimento de testes preliminares mostraram que essas linhagens são consideravelmente mais resistentes que as linhagens selvagens, e que nessas condições, permaneciam como grandes produtoras de toxinas.

De acordo com a hipótese desse estudo, duas possibilidades se apresentavam: as substâncias teste poderiam agir estimulando a expressão intracelular da microcistina ou levar a danos celulares que culminassem com o rompimento da célula e liberação das toxinas para o meio extracelular. Deste modo, os experimentos centraram-se na exposição das quatro linhagens às concentrações pré-definidas das substâncias-teste, com posterior separação dos extratos intra e extracelulares.

As determinações das microcistinas extraídas foram feitas por método imunoenzimático. Embora esse método não diferencie as variantes da toxina, sendo seu resultado expresso como microcistinas totais, é um método que oferece uma estimativa da quantidade de toxinas de forma simples e de rápida execução, exigindo processamento mínimo de amostra, sendo esse o método normalmente utilizado pelos serviços de saneamento no cumprimento da legislação pertinente para água potável (BRASIL, 2011).

As análises imunoenzimáticas, apesar de suas vantagens, não substituem a identificação e a quantificação que, em geral, é por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Por meio de nossa parceria, conseguimos que as análises fossem feitas pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC). As culturas foram processadas gerando os extratos intra e extracelular, e enviadas para o LETC, para realização com a colaboração do técnico do setor.

Durante os processos de extração e transporte ocorreram problemas que resultaram na perda de parte das amostras, comprometendo esses resultados.

Contudo, os resultados obtidos pelo método imunoenzimático permitiram observar um aumento na concentração de microcistina em três das quatro linhagens sob efeito de ciprofloxacino, e em duas das quatro linhagens sob efeito de clorexidina. Porém esses dados terão que ser complementados pelos dados quantitativos.

Destaca-se que apesar das limitações a proposta do estudo é inédita, apresentou resultados parciais promissores e apresenta, após repetição, grande possibilidade de publicação. Considera-se que apesar das limitações, a hipótese do estudo foi confirmada.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo avaliou-se a toxicidade do antimicrobiano ciprofloxacino e do biocida clorexidina para diferentes linhagens de cianobactérias do gênero *Microcystis*, e seus efeitos sobre a produção de microcistinas. As quatro linhagens se mostraram mais sensíveis ao antimicrobiano do que ao biocida. As linhagens consideradas “selvagens”, advindas de ambiente preservado, foram mais sensíveis à inibição do crescimento frente aos dois produtos farmacêuticos que as isoladas de locais impactados. Observamos também a grande diferença na produção de toxinas entre as linhagens. Aquelas originárias de ambientes poluídos produziram naturalmente e após exposição às substâncias teste alta concentração de microcistinas. Por meio do método imunoenzimático verificou-se que em contato direto com ciprofloxacino, três das quatro linhagens mostraram um aumento na produção de toxinas. Por outro lado, frente à clorexidina, duas das quatro linhagens mostraram aumento nas concentrações de microcistinas. Esses resultados confirmam a hipótese de que os microrganismos são afetados diretamente por resíduos de substâncias com atividade antimicrobiana. Esse achado indica que a presença do ciprofloxacino e da clorexidina em corpos d’água pode não só afetar o ecossistema aquático, mas também a produção e liberação de metabólitos secundários pelas espécies produtoras de toxinas, danosos para a população humana. Destaca-se a contribuição desse estudo na demonstração do impacto da contaminação ambiental por produtos farmacêuticos, aumentando o risco de que toxinas liberadas possam contaminar reservatórios de água para abastecimento público, indicando a necessidade de intervenções que reduzam a chegada desses poluentes aos corpos hídricos.

7. REFERÊNCIAS

- ANDO T, NAGASE H, EGUCHI K, HIROOKA T, NAKAMURA T, MIYAMOTO K, HIRATA K.. A novel method using cyanobacteria for ecotoxicity test of veterinary antimicrobial agentes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Osaka, v.26, n.4, p.601–606, 2007.
- BEIER RC, FOLEY SL, DAVIDSON MK, WHITE DG, MCDERMOTT PF, BODEIS-JONES S, ZHAO S, ANDREWS K, CRIPPEN TL, SHEFFIELD CL, POOLE TL, ANDERSON RC, NISBET DJ.. Characterization of antibiotic and disinfectant susceptibility profiles among *Pseudomonas aeruginosa* veterinary isolates recovered during 1994–2003. *Journal of Applied Microbiology*, Texas, v.118, p.326-342, 2014.
- BONEZ PC, DOS SANTOS ALVES CF, DALMOLIN TV, AGERTT VA, MIZDAL CR, FLORES VDA C, MARQUES JB, SANTOS RC, ANRAKU DE CAMPOS MM. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*. Santa Maria, v. 41, p. e119-e122, 2013.
- BRASIL. Ministério da saúde. Portaria n° 1469: Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. 2000.
- BRASIL. Ministério da saúde. Portaria n° 518: Estabelece as responsabilidades por parte de quem produz a água, a quem cabe o exercício do controle de qualidade da água e das autoridades sanitárias, a quem cabe a missão de “vigilância da qualidade da água” para consumo humano. 2004.
- BRASIL. Ministério da saúde, Portaria n° 2914: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 2011.
- CASSINI S, ANTUNES P, KELLER R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, Vitória, v. 36, n. 8, p.1208-1213, 2013.
- CASSIR N, THOMAS G., HRAIECH S., BRUNET J., FOURNIER PE., LA SCOLA B., PAPAIZIAN L. Chlorhexidine daily bathing: Impact on health care -associated infections caused by gram-negative bacteria. *American Journal of Infection Control xxx*, Marseille, p. 1-4, 2015.
- CATHERINE Q, SUSANNA W, ISIDORA ES, MARK H, AURÉLIE V, JEAN-FRANÇOIS H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e ecology, toxin production and risk management. *Water research*, Paris, v. 47, p. 5464-5479, 2013.
- CHANDRAN SP, DIWAN V, TAMHANKAR AJ, JOSEPH BV, ROSALES-KLINTZ S, MUNDAYOOR S, LUNDBORG CS, MACADEN R. Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with oqxAB gene in *Escherichia coli* in hospital wastewater: a matter of concern. *Journal of Applied Microbiology*, Bangalore, v.117, p.984—995, 2014.
- CHANTAL W, JANG HJ, TOGHROL F, BENTLEY WE. Global transcriptomic response of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorhexidine diacetate. *Environ. Sci. Technol*, Maryland, v.43, p.8406–8415, 2009.
- CHAPMAN PM. Harmful Algal Blooms Should Be Treated as Contaminants. *Integrated Environmental Assessment and Management*. British Columbia. v. 11, n. 4, p. 523–524. 2015.
- CODD G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecological Engineering*, Dundee, v.16, p. 51–60, 2000.
- CODD GA, MORRISON LF, METCALF JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Dundee, v. 203, p. 264-272, 2005.

- CONDELL O, POWER KA, HÄNDLER K, FINN S, SHERIDAN A, SERGEANT K, RENAUT J, BURGESS CM, HINTON JC, NALLY JE, FANNING S. Comparative analysis of *Salmonella* susceptibility and tolerance to the biocide chlorhexidine identifies complex cellular defense network. *Frontiers in microbiology*, Dublin, v.5, n.373, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00373
- CORBEL S, MOUGIN C, BOUAICHA N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, Versailles, v. 96, p. 1–15, 2014.
- DIAS E, OLIVEIRA M, JONES-DIAS D, VASCONCELOS V, FERREIRA E, MANAGEIRO V, CANIÇA M. Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater *Cyanobacteria* spp. *Frontiers in Microbiology*. Lisboa, v. 6, n. 799, 2015.
- EBRAHIMI A, HEMATI M, HABIBIAN DEHKORDI S, BAHADORAN S, KHOSHNOOD S, KHUBANI S, DOKHT FARAJ M, HAKIMI ALNI R. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, Shahrekord, v.9, n.2, 2014.
- EGUCHI K, NAGASE H, OZAWA M, ENDOH YS, GOTO K, HIRATA K, MIYAMOTO K, YOSHIMURA H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, Tokyo, v.57, p.1733–1738, 2004.
- EL-GAMEL N.E.A., HAWASH M.F., FAHMEY, M.A. Structure characterization and spectroscopic investigation of ciprofloxacin drug. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Cairo, v. 108, n. 1, p.253–262, 2012.
- FAN J, HOBSON P, HO L, DALY R, BROOKES J. The effects of various control and water treatment processes on the membrane integrity and toxin fate of cyanobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, Adelaide, v. 264, p. 313– 322, 2014.
- FATTA-KASSINOS D, MERIC S, NIKOLAOU A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal BioanalChem*, Cyprus, v. 399, p.251–275, 2011.
- FIGUEIREDO DR, AZEITEIRO UM, ESTEVES SM, GONÇALVES FJ, PEREIRA MJ. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Aveiro, v. 59, p. 151–163, 2004.
- GIRARDI C, GREVE J, LAMSHÖFT M, FETZER I, MILTNER A, SCHÄFFER A, KÄSTNER M. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, Leipzig, v.198, p.22–30, 2011.
- GKELIS S, PAPADIMITRIOU T, ZAOUTSOS N, LEONARDOS J. Anthropogenic and climate-induced change favors toxic cyanobacteria blooms: Evidence from monitoring a highly eutrophic, urban Mediterranean lake. *Harmful Algae*, Thessaloniki, v.39, p.322–333, 2014.
- GONZALEZ-PLEITER M, GONZALO S, RODEA-PALOMARES I, LEGANÉS F, ROSAL R, BOLTES K, MARCO E, FERNÁNDEZ-PIÑAS F. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, Madrid, v.47, p.2050–2064, 2013.
- GRINTEN E, PIKKEMAAT MG, VAN DEN BRANDHOF EJ, STROOMBERG GJ, KRAAK MH. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. Bilthoven, v. 80, p. 1–6, 2010.
- GRONING J, HELD C, GARTEN C, CLAUSSNITZER U, KASCHABEK SR, SCHLÖMANN M. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*.Freiberg,v.69, n. 4, p. 509–16. 2007.

HAIß A, KUMMERER K. Biodegradability of the X-ray contrast compound diatrizoic acid, identification of aerobic degradation products and effects against sewage sludge micro-organisms. *Chemosphere*.Freiburg, v. 62, n. 2, p. 294–302, 2006.

HALLING-SØRENSEN B, LÜTZHØFT HC, ANDERSEN HR, INGERSLEV F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Copenhagen. v. 46, n. 1,p. 53–58, 2000.

HERNÁNDEZ J.M., LÓPEZ-RODAS V., COSTAS E. Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: a risk intensified by global change. *Medical Hypotheses*, Madrid, v.72, n.5, p.539-40, 2009.

HOLTEN-LÜTZHØFT, H.C., HALLING-SØRENSEN, B., JØRGENSEN, S.E. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*.Copenhagen, v. 36, p. 1–6, 1999.

JOU S., MALEK N. Characterization and antibacterial activity of chlorhexidine loaded silver-kaolinite. *Applied Clay Science*, Skudai, p.127–128, 2016.

KOMAREK J, KOMARKOVA-LEGNEROVA J, SANT'ANNA CL, AZEVEDO MT, SENNA P. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie Algologie*, Dukelská, v.23, n.2, p.159-177, 2002.

KRUK C, HUSZAR V, PEETERS E, BONILLA S, COSTA L, LÜRLING M, REYNOLDS C, SCHEFFER M. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, Montevideo. v. 55, p. 614–627, 2010.

KUJBIDA P, HATANAKA E, CAMPA A, COLEPICOLO P, PINTO E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, São Paulo, v.341, p. 273–277, 2006.

KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, Freiburg, v.75, p.417–434, 2009.

KUMMERER K, Pharmaceuticals in the environment. *Annu. Rev. Environ. Resour*, Freiburg, v.35, p.57–75, 2010.

KULIK EM, WALTIMO T, WEIGER R, SCHWEIZER I, LENKEIT K, FILIPUZZI-JENNY E, WALTER C. Development of resistance of mutans *streptococci* and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clin Oral Invest*, Basel, Publicado online: DOI 10.1007/s00784-014-1379-y, 2014.

LE-MINH N, KHAN SJ, DREWES JE, STUETZ RM. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, New South Wales, v. 44, p.4295-4323, 2010.

LI T. YING L, WANG H, LI N, FU W, GUO Z, XU L. Microcystin-LR induces ceramide to regulate PP2A and destabilize cytoskeleton in HEK293 cells. *Toxicological sciences*, Hangzhou, v. 128, n. 1, p. 147–157, Abr. 2012.

LI Z, GENG M, YANG H. Algicidal activity of *Bacillus* sp. Lzh-5 and its algicidal compounds against *Microcystis aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*, Shanghai, v.99, p.981–990, 2015.

LIN S, HAAS S, ZEMOJTEL T, XIAO P, VINGRON M, LI R.. Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. *Gene*, v. 473, p. 139–149, 2011.

- LIU Y, GUAN Y, GAO B, YUE Q. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Jinan, v.86, p.23–30, 2012.
- LIU Y, GAO B, YUE Q, GUAN Y, WANG Y, HUANG L. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Jinan, v.77, p.79–87, 2012.
- LIU Y, ZHANG J, GAO B, FENG S. Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, Jinan, v.279, p.148–155, 2014.
- LIU Y, WANG F, CHEN X, ZHANG J, GAO B. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Jinan. v. 111, p. 138–145, 2015.
- LIU Y, CHEN S, ZHANG J, GAO B. Growth, microcystin-production and proteomic responses of *Microcystis aeruginosa* under long-term exposure to amoxicillin. *Water Research*, Jinan, v.93, p.141–152, 2016.
- MAIDANA M, CARLIS V, GALHARDI FG, YUNES JS, GERACITANO LA, MONSERRAT JM, BARROS DM. Effects of microcystins over short and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico-Biological Interactions*, Rio Grande, v.159, p.223–234, 2006.
- MEREL S, WALKER D, CHICANA R, SNYDER S, BAURÈS E, THOMAS O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, Tucson, v.59, p.303–327, 2013.
- MOREIRA C. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Porto, v.98, p.8073–8082, 2014.
- NGUYEN V, TANABE Y, MATSUURA H, KAYA K, WATANABE MM. Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycological Research*, Tsukuba, v.60, p.208–222, 2012.
- O'NEIL JM, DAVIS TW, BURFORD MA, GOBLER CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, Maryland, v.14, p.313–334, 2013.
- OU HS, YE J, MA S, WEI C, GAO N, HE JZ. Degradation of ciprofloxacin by UV and UV/H₂O₂ via multiple-wavelength ultraviolet light-emitting diodes: Effectiveness, intermediates and antibacterial activity. *Chemical Engineering Journal*. Guangzhou, v. 289, p. 391–401, 2016.
- PAERL HW, HALL NS, CALANDRINO ES. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment*, Morehead City, v.409, p.1739–1745, 2011.
- PAERL HW, PAUL VJ. Climate change: Links to global expansion of harmful Cyanobacteria. *Water research*, Morehead City, v.46, p.1349-1363, 2012.
- PANTELIC D, SVIRČEV Z, SIMEUNOVIĆ J, VIDOVIĆ M, TRAJKOVIĆ I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*, Novi Sad, v. 91, p. 421-441, 2013.
- PERGA ME, DOMAIZON I, GUILLARD J, HAMELET V, ANNEVILLE O. Are cyanobacterial blooms trophic dead ends? *Oecologia*, Thonon, v.172, p.551–562, 2013.

- POURIA, S. DE ANDRADE A, BARBOSA J, CAVALCANTI RL, BARRETO VT, WARD CJ, PREISER W, POON GK, NEILD GH, CODD GA. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, London, v.352, p. 21-26, 1998
- PRAG G, FALK-BRYNHILDSSEN K, JACOBSSON S, HELLMARK B, UNEMO M, SÖDERQUIST B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS*, Orebro, v.122, p.961–967, 2014.
- RASTOGI RP, SINHA RP, INCHAROENSAKDI A. The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Rev Environ SciBiotechnol*, Bangkok, v. 13, p. 215–249, 2014.
- RASTOGI RP, MADAMWAR D, INCHAROENSAKDI A. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and Their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Frontiers in Microbiology*, Bangkok, v. 6 n. 1254, p. 1-22, 2015.
- REMA T, LAWRENCE JR, DYNES JJ, HITCHCOCK AP, KORBER DR. Microscopic and spectroscopic analyses of chlorhexidine tolerance in *Delftia acidovorans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Saskatchewan, v.58, n.10 p. 5673–5686, 2014.
- ROBINSON AA, BELDEN JB, LYDY MJ. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Carbondale, v. 24, n. 2, p. 423–430, 2005.
- RAMANAN R, KIM BH, CHO DH, OH HM, KIM HS. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*. Daejeon. v. 34 p. 14–29, 2016.
- RODRIGUES-SILVA C, MANIERO M, PERES M, GUIMARÃES JR. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. *Quim. Nova*, Campinas, v.37, n.5, p.868-885, 2014.
- SÁ LLC; VIEIRA JM; MENDES RA; PINHEIRO SC; VALE ER; ALVES FA; JESUS IM; SANTOS ECO; COSTA VB. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do rio Tapajós, no município de Santarém (Pará, Brasil). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. Pará, v.1, n.1, p.159-166. 2010.
- SCHLETT CD, MILLAR EV, CRAWFORD KB, CUI T, LANIER JB, TRIBBLE DR, ELLIS MW. Prevalence of Chlorhexidine-Resistant Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* following Prolonged Exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Maryland, v.58, n.8, p. 4404–4410, 2014.
- SEGURA PA, FRANÇOIS M, GAGNON C, SAUVÉ S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental Health Perspectives*, v.117, n.5, p. 675, 2009.
- SOARES MCS, HUSZAR V, MIRANDA M, MELLO M, ROLAND F, LÜRLING M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*, Juiz de Fora, v.717, p.1–12, 2013.
- TAYLOR D, SENAC T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. *Chemosphere*. Faringdon, v. 115, p. 95–99, 2014.
- TRAUTWEIN C, METZGER J, KUMMERER K. Aerobic biodegradability of the calcium channel antagonist verapamil and identification of a microbial dead-end transformation product studied by LC-MS/MS. *Chemosphere*. v.72, n. 3, p. 442–50, 2008.
- VASCONCELOS T, KÜMMERER K, HENRIQUES DM, MARTINS AF. Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. *Journal of Hazardous Materials*, Santa Maria, v.169, p.1154–1158, 2009.

WANG J, CHU L. Irradiation treatment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in water and wastewater: An overview. *Radiation Physics and Chemistry*. Beijing, v. 125, p. 56–64, 2016.

WHO. Guidelines for Safe Recreational-water Environments. World Health Organization; Volume 1: Coastal and Freshwaters. Chapter 7: Freshwater algae and cyanobacteria; p.125–209, 1998.

WOOD R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. *Environment International*. Perth. v. 91, p. 276–282, 2016.

YANG JD, HU LB, ZHOU W, YIN YF, CHEN J, SHI ZQ. Lysis of *Microcystis aeruginosa* with Extracts from Chinese Medicinal Herbs. *International Journal of Molecular Sciences*, Nanjing, v.10, p.4157-4167, 2009.

ZHANG H, YU Z, HUANG Q, XIAO X, WANG X, ZHANG F, WANG X, LIU Y, HU C. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa*. *Limnologica*, Anhui, v.41, p.70–77, 2011.

ZHANG Q, JIA A, WAN Y, LIU H, WANG K, PENG H, DONG Z, HU J. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: association with antibiotic-resistant. *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol*, Beijing, v.48, p.14317–14325, 2014.

ZHANG J, RUI GUAN, HU-JUN ZHANG, HUA LI, PENG XIAO, GONG-LIANG YU, LEI DU, DE-MIN CAO, BING-CHUAN ZHU, REN-HUI LI, ZU-HONG LU. Complete genome sequence and genomic characterization of *Microcystis panniformis* FACHB 1757 by third-generation sequencing. *Standards in Genomic Sciences*, Nanjing, v.11, n.11, 2016.

ZHOU L, YU H, CHEN K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Science*, Zhejiang Province, v.15, n.2, p.166-71, 2002.

ZHOU S, SHAO Y, GAO N, DENG Y, QIAO J, OU H, DENG J. Effects of different algacides on the photosynthetic capacity, cell integrity and microcystin-LR release of *Microcystis aeruginosa*. *Science of the Total Environment*, Shanghai, v. 463–464, p. 111–119, 2013.

ZHOU Z, JIANG JQ. Reaction kinetics and oxidation products formation in the degradation of ciprofloxacin and ibuprofen by ferrate (VI). *Chemosphere*. Glasgow, v. 119, p. S95–S100, 2015.

ZHOU J, ZHU T, CAI Z, LI Y. From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. *Microbial Cell Factories*. Beijing, v.15, n.2, p.1-9, 2016.