

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VITÓRIA BITENCOURT

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA FITORREMEDIAÇÃO DE CIPROFLOXACINA
UTILIZANDO BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS EM PEIXES**

CURITIBA

2021

VITÓRIA BITENCOURT

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA FITORREMEDIAÇÃO DE CIPROFLOXACINA
UTILIZANDO BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS EM PEIXES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso da Universidade Federal do Paraná como
requisito parcial à obtenção do grau de Biomédica

Orientador: Prof Dr Aleksander Roberto
Zampronio

Co-orientadora: Profa Dra Helena C. Silva de
Assis

Co-orientador: Rafael Shinji Akiyama Kitamura

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

VITÓRIA BITENCOURT

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA FITORREMEDIAÇÃO DE CIPROFLOXACINA UTILIZANDO BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS EM PEIXES

TCC apresentada ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

Orientador – Departamento de Farmacologia, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Profa. Dra. Izonete Guiloski

Toxicologia, INSTITUTO DE PESQUISAS PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE

Prof. Dr. Paulo R Dalsenter

Departamento Farmacologia, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 15 de Dezembro de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse TCC para meus Pais, Bisavó, irmã e principalmente a senhora, Vó Iara, que aonde quer que esteja sei que cuida de mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais Cirineu e Tatiana por sempre me apoiarem nos estudos, me darem a oportunidade de correr atrás dos meus sonhos e me ensinarem que o mundo pode ser meu, desde que eu faça por onde.

Em segundo lugar, agradecer à minha bisavó Maria Helena, por cuidar de mim desde que nasci e me ensinar a ser quem sou hoje, obrigada por todo o seu apoio e amor. Não posso deixar de agradecer a minha irmã, Ana Clara, por sempre estar presente para me ouvir e ajudar a ver o mundo de um jeito diferente. Amo todos vocês, obrigada por serem minha base e meu suporte nesses anos.

Em terceiro lugar gostaria de agradecer a todos os meus amigos, os que estão comigo desde a época de escola e que mesmo que distantes sempre me apoiaram, obrigada Yasmin, Fernanda, Thainá, Júlia, e João Victor, e a amigos que sempre estiveram comigo como a Letícia Yasmin, Letícia Pereira, Gabriela, Giovanna, Paulo e Glendha. Não posso deixar de agradecer aos amigos que conheci durante a graduação e me ajudaram a chegar onde estou passando perrengues, estudando juntas ou se estressando com muitos trabalhos em grupo, obrigada Rebeca, Vanessa e Isabella. Não posso deixar de mencionar os amigos que fiz no começo da graduação, mas que foram trilhar outros caminhos, Felipe, Renan e Ágata, muito obrigada. Sem meus amigos não teria conseguido concluir esse curso, amo vocês!

Por último, não posso deixar de agradecer ao Laboratório de Toxicologia Ambiental e principalmente a Prof^a Dr^a Helena Cristina de Assis pela oportunidade de fazer parte do melhor laboratório da Farmacologia UFPR e realizar meu TCC nele, além do Prof^o Dr^o Aleksander Zampronio que aceitou ser meu orientador, agradeço pelo conhecimento passado. Não posso deixar de mencionar toda a minha gratidão ao Rafael Kitamura, que me apoiou e ajudou desde o começo, obrigada por todas as reuniões, correções e terapias. Sem vocês e sem a oportunidade de estar na UFPR cursando a Biomedicina esse TCC não teria saído.

“Não deixe o medo mantê-la quieta. Você tem uma voz, então use-a!”

(RIMES, Shonda, 2010)

RESUMO

Ciprofloxacina é um antibiótico comumente detectado nos corpos hídricos de todo mundo. Apesar de sua eficiência no tratamento de doenças humanas, este antibiótico pode causar efeitos adversos a organismos não-alvos, como os peixes. Como os antibióticos não são removidos completamente pelos sistemas convencionais de tratamento de água e esgoto, podem impactar diretamente os ecossistemas aquáticos. Desta forma, técnicas alternativas de tratamento de água são necessárias, sendo uma delas a fitorremediação. Visto que poucos estudos avaliam a toxicidade aguda de pós-tratamentos alternativos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da fitorremediação de ciprofloxacina para a mitigação de possíveis alterações hematológicas e de genotoxicidade em uma espécie de peixe nativo. Para tanto, peixes da espécie *Rhamdia quelen* foram expostos a duas concentrações de ciprofloxacina, sendo os grupos experimentais: Controle (0), 1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após 96 horas, os peixes foram anestesiados e o sangue coletado para as seguintes análises hematológicas: contagem total do número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, dosagem de hemoglobina e hematócrito. Além disso, foram realizadas análises de genotoxicidade pelo ensaio cometa. Posteriormente, foi avaliada a eficiência da fitorremediação utilizando a macrófita aquática *Salvinia molesta*. Para tanto, foram testadas as mesmas concentrações (1 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de ciprofloxacina juntamente com as macrófitas durante 96 horas. Após este período, os animais foram expostos à água tratada também 96 horas e, após a anestesia, foi coletado o sangue para as análises hematológicas. Os resultados mostraram que ciprofloxacina causou a redução da concentração de hematócrito, número de hemácias, leucócitos e trombócitos totais. Além disso, houve aumento de danos de DNA para todas as concentrações de antibiótico testadas, quando comparadas ao controle. Após o tratamento por fitorremediação, não foram observadas alterações hematológicas nos peixes expostos, demonstrando que a técnica de fitorremediação foi eficaz para a redução da toxicidade. Desta forma conclui-se que a fitorremediação é um tratamento eficaz e permite a redução de alterações à saúde de organismo não-alvo, como peixes expostos a antibióticos.

Palavras-chave: Ecotoxicidade, antibióticos, *Rhamdia quelen*, macrófitas aquáticas,

ABSTRACT

Ciprofloxacin is an antibiotic commonly detected in water bodies around the world. Despite its effectiveness in treating human diseases, this antibiotic can cause adverse effects to non-target organisms such as fish. As antibiotics are not completely removed by conventional water and sewage treatment systems, they can directly impact aquatic ecosystems. Therefore, alternative water treatment techniques are needed, one of which is phytoremediation. Since few studies assess the acute toxicity of alternative post-treatments, the aim of the present work was to evaluate the efficiency of ciprofloxacin phytoremediation to mitigate possible hematological and genotoxicological alterations in a native fish species. Therefore, fish of the species *Rhamdia quelen* were exposed to two concentrations of ciprofloxacin, the experimental groups being: Control (0), 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. After 96 hours, the fish were anesthetized and blood collected for the following hematological analyses: total count of the number of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes, measurement of hemoglobin and hematocrit. Furthermore, the genotoxicity analysis by comet assay were evaluated. Subsequently, the efficiency of phytoremediation was evaluated using the aquatic macrophyte *Salvinia molesta*. Therefore, the same concentrations (1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) of ciprofloxacin were tested together with the macrophytes for 96 hours. After this period, the animals were also exposed to treated water for 96 hours and, after anesthesia, blood was collected for hematological analysis. The results showed that ciprofloxacin caused a reduction in hematocrit, number of red blood cells, leukocytes and total thrombocytes. Furthermore, there was an increase in DNA damage for all tested antibiotic concentrations, when compared to the control. However, after treatment by phytoremediation, no hematological changes were observed in exposed fish, demonstrating that the remediation technique was effective in reducing toxicity. Thus, it is concluded that phytoremediation is an effective treatment and allows the reduction of health alterations in non-target organisms, such as fish exposed to antibiotics.

Keywords: Ecotoxicity, antibiotics, fish, aquatic macrophytes,

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Possíveis rotas dos fármacos no ambiente	17
FIGURA 2 – Mecanismo de ação das fluoroquinolonas	19
FIGURA 3 – Estrutura química da CIP	20
FIGURA 4 – Peixe da espécie <i>Rhamdia quelen</i>	25
FIGURA 5 – Exemplos de <i>Salvinia molesta</i>	26
FIGURA 6 – Desenho do bioensaio	27
FIGURA 7 – Método de preparo do ensaio cometa	28
FIGURA 8 – Método de avaliação do ensaio cometa conhecido como Score	28
FIGURA 9 – Microcentrifuga para a realização do hematócrito.....	30
FIGURA 10 – Hematócrito	31
FIGURA 11 – Escore de danos ao DNA	32
FIGURA 12 – Número de leucócitos (A) e trombócitos totais (B)	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeitos de diferentes concentrações de CIP e os efeitos do pós-tratamento utilizando <i>Salvinia molesta</i> em biomarcadores hematológicos de <i>Rhamdia quelen</i>	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CIP	- Ciprofloxacina
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
Hb	- Hemoglobina
Ht	- Hematócrito
FITO	- Fitorremediação
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Contaminação de corpos hídricos por antibióticos	16
2.2.1 Ciprofloxacina	19
2.4 Peixes como modelos de estudo para avaliações ecotoxicológicas	21
2.4.1 Uso de biomarcadores hematológicos	22
2.4.2 Uso de biomarcadores de genotoxicidade	22
2.5 Uso da fitorremediação para o tratamento de águas contaminadas por antibióticos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção e aclimação dos peixes	25
3.2 Obtenção e aclimação das macrófitas	25
3.3 Desenvolvimento do bioensaio	26
3.4 Avaliação de Biomarcadores de genotoxicidade	27
3.5 Avaliação de Biomarcadores Hematológicos	29
3.5.1 Contagem do número total de eritrócitos	29
3.5.2 Dosagem de hemoglobina	29
3.5.3 Hematócrito	29
3.5.4 Determinação do número total de leucócitos e trombócitos	31
3.6 Análise de dados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Genotoxicidade em sangue de peixes R. quelen	32
4.2 Alterações hematológicas em peixes R. quelen	33
5. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático está constantemente exposto a diferentes contaminantes. A fonte dessa contaminação é advinda principalmente de atividades antrópicas, como: efluentes industriais, atividades agropecuárias (fertilizantes, agrotóxicos), derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos (elementos traços, compostos orgânicos e inorgânicos) e esgotos domésticos. Esses contaminantes são carregados para rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos (RASHED, 2001). Desta forma, o monitoramento ambiental é um processo necessário, pois possibilita o diagnóstico de possíveis impactos negativos provocados pela ação antrópica (CASTRO et al., 2018).

Um dos principais contaminantes encontrados no ambiente aquático são os antibióticos e alguns deles são prejudiciais aos peixes (YANG, et al., 2020). Dentre os antibióticos mais utilizados mundialmente, está a ciprofloxacina (CIP). Este fármaco é pertencente à classe das fluoroquinolonas e é utilizado para o tratamento de doenças do sistema gastrointestinal e respiratório em seres humanos (CHEN et al., 2015). Concentrações que podem variar de ng.L^{-1} a mg.L^{-1} já foram detectadas em ecossistemas aquáticos. Mesmo em baixas concentrações, este xenobiótico pode ocasionar diversos problemas ambientais, como a indução de cepas resistentes a antibióticos, bem como efeitos adversos a organismos não-alvo (ZHENG et al, 2019). Alguns efeitos observados em peixes, por exemplo, foram alterações como, por exemplo: redução da atividade locomotora em larvas, neurotoxicidade e alterações de atividades de enzimas do sistema antioxidante (NOGUEIRA et al., 2019), aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e geração de estresse oxidativo (YANG et al., 2020). Além disso, alterações em parâmetros hematológicos, como o aumento de casos de anemia já foram detectados em peixes da espécie *Cirrhinus mrigala* (RAMESH et al., 2019). Desta forma, faz-se necessário estudos ecotoxicológicos para avaliar os efeitos adversos desses antibióticos em peixes nativos.

Um modelo de estudo amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos, nos ambientes aquáticos, são os peixes. Esses animais possuem potencial de

acumulação de contaminantes com capacidade de biomagnificação na cadeia trófica. Com este modelo de estudo é possível avaliar possíveis alterações presentes nos ambientes aquáticos, principalmente quando são realizados estudos utilizando biomarcadores. Dentre as espécies nativas brasileiras, peixes *Rhamdia quelen* (jundiá) têm sido utilizados como modelo de estudo indicado para testar efeitos toxicológicos de fármacos (GUILOSKI et al., 2017a ; MATHIAS., 2018 PERUSSOLO et al., 2019).

Os biomarcadores podem detectar precocemente alterações biológicas nos seres vivos, principalmente quando há a exposição a estressores, como xenobióticos e/ou alterações ambientais (FREIRE et al, 2008). O uso de biomarcadores hematológicos é um método indicado para análises ecotoxicológicas, pois fornece informações indispensáveis ao controle evolutivo das doenças (FAILACE, 2006), visto que o sangue é um reflexo fisiopatológico do organismo. Desta forma, quando há alterações nos parâmetros hematológicos é possível detectar os efeitos causados por xenobióticos de forma rápida e passível de realizar a mitigação de impactos causados antes que ocorra a morte dos organismos (RAMESH et al, 2019). Além disso, já foi evidenciado que o uso de biomarcadores de genotoxicidade é uma análise que pode corroborar para o melhor entendimento de toxicidade de antibióticos em peixes (RODRIGUES et al. 2017).

Entretanto, além da necessidade de investigação de efeitos ecotoxicológicos causados por antibióticos, como a CIP, estudos de mitigação dos efeitos que esses xenobióticos podem ocasionar para os ecossistemas, bem como removê-los do ambiente são importantes. Sendo assim, faz-se necessário a busca por técnicas alternativas eficientes para a remoção desses fármacos da água, visto que os sistemas convencionais de tratamento de água e esgoto não conseguem remover eficazmente os antibióticos (YANG et al., 2020). Desta forma, um método alternativo que pode ser implementado é a fitorremediação. Esta técnica consiste no uso de plantas (terrestres, aquáticas ou semiaquáticas) para remediar o solo ou a água contaminada, sendo uma alternativa eficiente e de baixo custo (ETIM et al, 2017). Esta técnica é considerada uma alternativa indicada, pois é um método eficiente e apresenta baixo custo, quando comparado aos tratamentos físicos e químicos (MUSTAFA et al., 2020). Rocha et al., (2021) demonstrou a eficiência deste

sistema de tratamento para a remediação de águas contaminadas por antibióticos. Dentre as diferentes espécies de macrófitas aquáticas, Mustafa et al., (2020) menciona a eficiência de *Salvinia molesta* para a técnica de fitorremediação, pois possui um potencial de bioacumulação e um rápido crescimento e desenvolvimento (MUSTAFA et al., 2020). Apesar desses estudos demonstrarem a eficiência, poucos estudos avaliando a ecotoxicidade aguda com peixes em pós-tratamentos de água têm sido desenvolvidos, principalmente por tratamentos de fitorremediação. Dentre esses poucos estudos, Bauer et al. (2020) verificaram que após o uso de macrófitas aquáticas em um sistema de *wetlands* para o tratamento de esgoto doméstico, ocorreu a remoção dos contaminantes orgânicos, bem como, a redução de toxicidade em peixes *Danio rerio*. Diante disso, destaca-se a importância da presente monografia, visto à aplicação do tratamento por fitorremediação de CIP, ainda não testada com *S. molesta*, bem como, a avaliação da mitigação de efeitos adversos em uma espécie de peixe nativo. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência da fitorremediação de ciprofloxacina por *Salvinia molesta* para a mitigação de possíveis alterações hematológicas e de genotoxicidade em peixes *Rhamdia quelen*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso da fitorremediação por *Salvinia molesta* para a mitigação de alterações hematológicas e de genotoxicidade promovidas por CIP em peixes *Rhamdia quelen*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar as alterações hematológicas e a genotoxicidade induzidas por CIP em *R. quelen*.
- Avaliar a eficiência do pós-tratamento da água para a mitigação de alterações hematológicas e genéticas causadas por CIP em *R. quelen*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação de corpos hídricos por antibióticos

Os antibióticos são uma classe de fármacos utilizados principalmente no tratamento de doenças bacterianas, tanto por seres humanos quanto na medicina veterinária (XU et al., 2014). São capazes de inibir a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e parede celular, além de inibir a divisão celular e a replicação do DNA bacterianos (YANG et al., 2020).

Geralmente são compostos polares e de baixa volatilidade, o que facilita a sua chegada aos ambientes aquáticos (RAMESH et al., 2018). Alguns desses fármacos são metabolizados pelos organismos, contudo uma parte permanece inalterada e acaba sendo excretada na urina e nas fezes. Essas moléculas acabam chegando nos esgotos em sua forma *in natura*, o que dificulta a sua remoção (KAF AEI et al., 2018). Portanto, o sistema de esgoto é um dos principais transportadores de antibióticos para o meio ambiente (ZHANG et al., 2013).

O consumo elevado, aliado ao descarte incorreto, pode se tornar um problema ambiental e de saúde pública, visto que esses fármacos podem levar ao aumento da incidência de cepas bacterianas resistentes (RAMESH et al, 2018), o que de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma das maiores ameaças à saúde global (LOUREIRO et al, 2016).

Além dos sistemas de esgoto, os antibióticos podem atingir o meio ambiente por meio dos efluentes hospitalares e de indústrias farmacêuticas (RAMESH et al., 2018) e outras fontes (Figura 1). Esses fármacos já foram detectados em rios, águas subterrâneas, oceano, sedimentos e solo (NWANI et al., 2013). A contaminação dos corpos hídricos é um problema em escala mundial e o processo de tratamento adotado não é específico e eficaz para a remoção dos antibióticos (RAMESH et al., 2018).

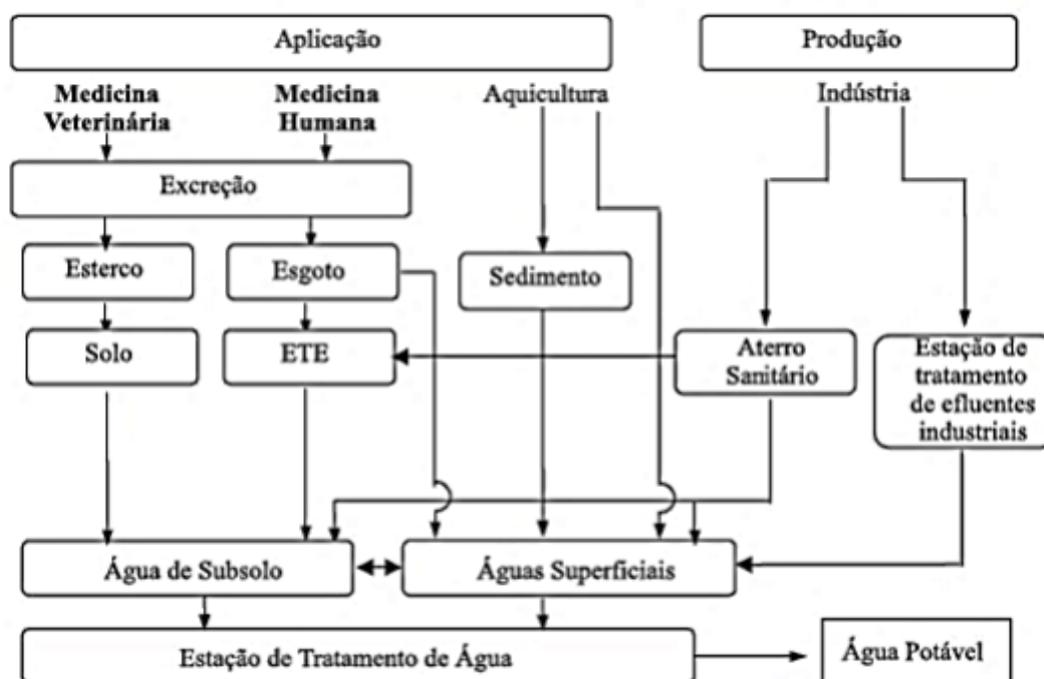


Figura 1. Possíveis rotas dos fármacos no ambiente

Fonte: Bila e Dezotti (2003)

Em um estudo no lago Taihu, na China, os antibióticos mais encontrados em águas superficiais foram sulfonamidas, fluoroquinolonas, macrolídeos e tetraciclina (XU et al., 2014). Outro estudo em Portugal relatou elevadas concentrações de ofloxacina (aproximadamente 10 mg.L^{-1}) e CIP (aproximadamente 3 mg.L^{-1}) em efluentes hospitalares. Neste estudo, a concentração em efluentes hospitalares variaram de 4886 ng.L^{-1} no verão e $322.735 \text{ ng.L}^{-1}$ no inverno, sendo azitromicina, claritromicina e CIP os antibióticos com maiores concentrações detectadas (YANG et al., 2020).

A presença desses fármacos nas águas traz um risco para os organismos não-alvos, pois eles são sensíveis à contaminação do seu ambiente, e a presença de antibióticos, por exemplo, pode alterar significativamente sua fisiologia (NWANI et al., 2013)

2.2 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são a classe de antibióticos mais comumente encontrada no solo e nas águas subterrâneas, o que causa efeitos crônicos em seres humanos e pode trazer problemas ao ecossistema aquático (CHEN et al., 2015). É um grupo de antibióticos utilizado para tratar doenças infecciosas tanto em humanos como em animais, bem como, no combate às bactérias Gram-negativas e positivas. Alguns dos problemas tratados são: infecções no trato urinário (superior e inferior), infecções no trato respiratório, pele, ossos, tecidos moles e pneumonia adquirida. Além dessas funções típicas das fluoroquinolonas há as atípicas como: antitumoral, antituberculoso, anti-HIV, antimalárico e atividades anti- Alzheimer (EZELARAB et al., 2018).

As fluoroquinolonas são antibióticos considerados como uma evolução das quinolonas devido à adição de um átomo de flúor em sua composição. Essa modificação na estrutura química do fármaco aumentou o espectro de ação dessa classe de antibióticos, permitindo maior eficiência para o combate de bactérias e no controle de infecções. Contudo, essa alteração aumentou o grau de persistência desses fármacos, sendo um dos principais fatores que justificam a detecção frequente nos ambientes. Essa classe possui uma baixa biodegradabilidade e uma pequena porcentagem dela é absorvida pelos organismos, o que faz com que os compostos não metabolizados sejam excretados, resultando na sua presença no esgoto e nas águas (CHEN et al., 2015, YANG et al., 2020).

As fluoroquinolonas são classificadas conforme o seu espectro de ação e seu perfil farmacocinético. Sendo assim, são consideradas quatro gerações desses fármacos. Dentre os exemplos estão: CIP, norfloxacin, levofloxacin, entre outros (EZELARAB et al., 2018).

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas é por meio da inibição da replicação e da transcrição do DNA bacteriano, o que pode resultar na morte celular. Podem inibir a atividade da DNA girase, Topoisomerase IV e/ou impedir o desprendimento da girase do DNA. A girase bacteriana é diferente o suficiente da topoisomerase de mamíferos, de modo que as fluoroquinolonas são 1000 vezes mais seletivas em relação às bactérias do que em relação à enzima correspondente em humanos (EZELARAB et al., 2018).

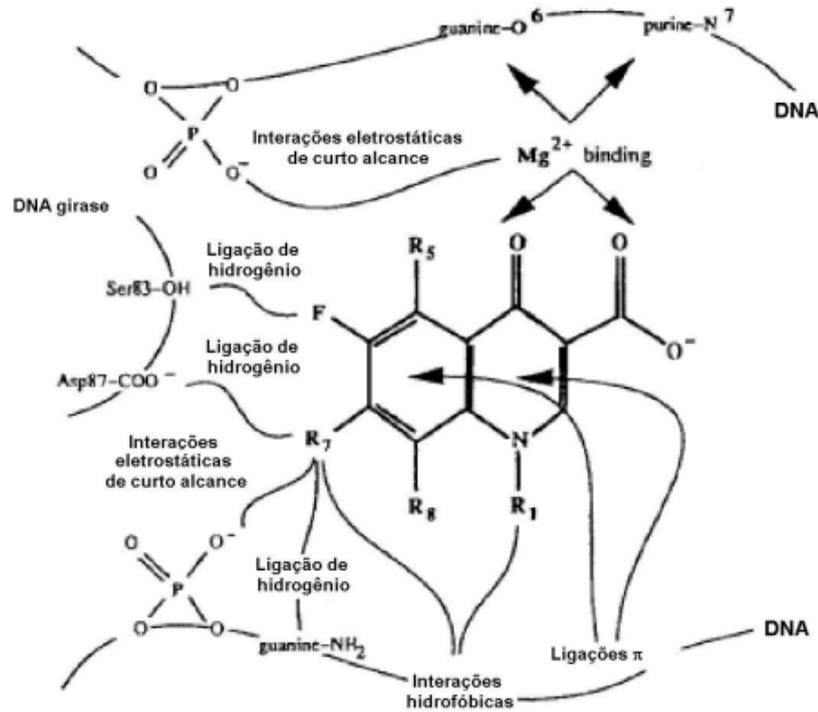


Figura 2. Mecanismo de ação das fluoroquinolonas.

(Mitscher, 2005)

2.2.1 Ciprofloxacina

A CIP (Fig.2) é uma das principais fluoroquinolonas utilizadas mundialmente (IGWEGBE et al., 2020). É um fármaco que pertence à segunda geração das fluoroquinolonas e é ativo contra a maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, *Neisseria* (SANDERS,1988; EZELARAB, 2018). Recomenda-se o uso deste antibiótico para o tratamento de infecções na bexiga, pielonefrite, doenças sexualmente transmissíveis, tipos específicos de pneumonia, infecções de pele e infecções do trato urinário (IGWEGBE et al., 2020).

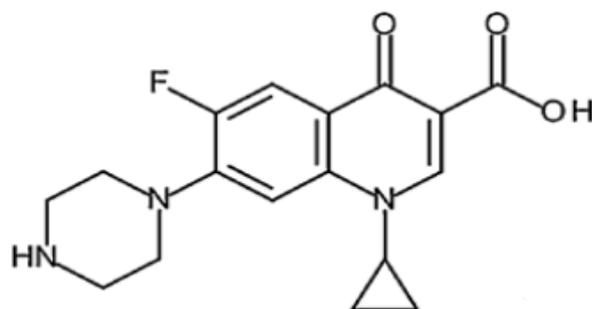


Figura 3. Estrutura química da CIP

Fonte: Wikipedia (2020)

Ciprofloxacina já foi detectada em águas superficiais e efluentes hospitalares, nas concentrações de $2,45 \times 10^4$ mg.L⁻¹ a $6,3 \times 10^4$ mg.L⁻¹ e $7,0 \times 10^4$ a $0,1245$ mg.L⁻¹, respectivamente (IGWEGBE et al., 2020). Em efluentes de estação de tratamento de esgoto na Suíça e na Índia já foram encontradas concentrações de 62 ng.L⁻¹ a 106 ng.L⁻¹ e 14 mg.L⁻¹, respectivamente. Além disso, em lagos e efluentes hospitalares na Índia foram detectados os valores de $2,5$ mg.L⁻¹ a $6,5$ mg.L⁻¹ e 3 µg.L⁻¹ para 87 µg.L⁻¹, respectivamente (ZIVNA et al., 2015).

2.3 Toxicidade da Ciprofloxacina a organismos não-alvos

A CIP é constantemente encontrada no ambiente aquático devido a sua alta estabilidade e baixa taxa de degradação. Diante disso, pode ocorrer a indução de genes de resistência a antibióticos, o que pode afetar principalmente a saúde humana (YAN et al., 2019).

A geração de cepas resistentes em bactérias é um dos maiores problemas de saúde pública, de acordo com a OMS (LOUREIRO et al., 2016). As bactérias multirresistentes são microrganismos que apresentam resistência à maioria dos antibióticos, como a CIP. Desta forma, a geração de bactérias resistentes e o aumento de genes de resistência, ocasionam infecções que não conseguem ser tratadas pelos medicamentos convencionais já utilizados, o que pode aumentar o número de infecções generalizadas nos pacientes (COUTO, 2003).

Efeitos adversos para organismos fotossintéticos já foram evidenciados, também. Em microalgas, por exemplo, já foram detectados efeitos como a

diminuição da concentração do teor clorofila e da atividade fotossintética, além da inibição da proliferação e crescimento celular (LIU et al., 2017).

Além de causar problemas a organismos fotossintetizantes, a CIP pode causar problemas em vertebrados, como peixes. Esse fármaco pode induzir o sistema de defesa antioxidante, inativar enzimas do Citocromo P450, causar neurotoxicidade, dano ao DNA e desordem locomotora em peixes (LIU et al., 2017). Zivna et al., (2016) estudaram os efeitos sobre embriões e larvas de *Cyprinus carpio* (carpas), do 1º dia de fertilização até o 33º dia de desenvolvimento das larvas e, constataram deformações e anomalias morfológicas, mortalidade, efeitos sobre o sistema antioxidante, além de efeitos para sobre o tamanho, indicando redução de crescimento.

2.4 Peixes como modelos de estudo para avaliações ecotoxicológicas

Os peixes são uma fonte de recurso humano, principalmente para a alimentação. Entretanto, esses organismos podem acumular contaminantes presentes no ambiente em que vivem, principalmente por causa da biomagnificação através da cadeia trófica (CASTRO et al., 2018).

A presença de xenobióticos em águas residuais, rios e oceanos é um risco para organismos não-alvos, como os peixes, pois eles apresentam sensibilidade à contaminação do ambiente, tornando-os importantes indicadores de saúde do meio aquático (NWANI et al., 2013).

A preferência dos peixes para estudos ecotoxicológicos em meios aquáticos, deve-se ao fato de eles ocuparem diferentes níveis tróficos, além de ser possível avaliar alterações no sistema nervoso, endócrino, imunológico e osmorregulatório (YANCHEVA et al., 2015).

Uma espécie de peixe que tem sido utilizada em estudos ecotoxicológicos é o *Rhamdia quelen*, popularmente conhecido como jundiá. Considerada uma espécie de água doce e nativo da América do Sul, este peixe é comercializado no Brasil por sua fácil domesticação e adaptação às condições de cultivo. Estudos ecotoxicológicos com a exposição do jundiá a diversos xenobióticos, principalmente a fármacos, demonstram o potencial do uso desta espécie em

estudos de toxicologia ambiental, principalmente devido à sua sensibilidade a estes contaminantes (GUILOSKI et al., 2017a,b; PERUSSOLO et al., 2019; MATHIAS, 2018).

2.4.1 Uso de biomarcadores hematológicos

Os biomarcadores podem contribuir para a detecção precoce de alterações biológicas nos seres vivos, indicando efeitos adversos quando há a exposição a estressores, como xenobióticos e/ou alterações ambientais (FREIRE et al, 2008).

Para avaliar os efeitos adversos causados por contaminantes, como os fármacos, pode-se avaliar diversas respostas biológicas (biomarcadores) que detectam possíveis efeitos que esses xenobióticos podem causar para os organismos vivos. Dentre os diferentes biomarcadores que podem ser utilizados, os biomarcadores hematológicos são um dos mais recomendados, visto que o sangue é um reflexo fisiopatológico do organismo (RAMESH et al., 2019).

A análise dos parâmetros hematológicos em peixes pode fornecer informações importantes sobre o estado fisiológico e imunológico deles, e podem ser utilizados como indicadores de saúde do ambiente aquático (NWANI et al., 2013). Tais respostas podem fornecer informações indispensáveis sobre o controle evolutivo das doenças (FAILACE, 2006), permitindo a detecção precoce de alterações na saúde do animal.

Os biomarcadores hematológicos normalmente analisados são: hematócrito, hemoglobina, contagem total do número de eritrócitos (células vermelhas) e contagem total do número de leucócitos (células brancas) (RAMESH et al., 2018).

2.4.2 Uso de biomarcadores de genotoxicidade

Sabe-se que a exposição de vertebrados, como os peixes, a xenobióticos pode causar alterações no DNA, resultando em mutações (HUSSAIN et al., 2017). Como mencionado, o mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste na

inibição da DNA girase, e/ou das topoisomerasas (EZELARAB et al., 2018), onde a topoisomerase II é encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos. Conhecendo esse mecanismo, pode-se assumir que a interação desses animais com esse fármaco tende a gerar efeitos de genotoxicidade (HERBOLD et al., 2001).

Para analisar essas possíveis alterações no DNA, e assim os efeitos de genotoxicidade, utiliza-se de um teste conhecido como Ensaio Cometa. Este ensaio é utilizado para avaliar a mutagenicidade de xenobióticos, como os fármacos (KUMAR et al., 2015). O ensaio cometa evidencia os fragmentos de DNA, os quais são observados pela formação de uma cauda, a qual aparenta ser de um cometa (KANAAR; HOEIJMAKERS; VAN GENT, 1998).

Sabe-se que antibióticos podem causar danos por genotoxicidade em peixes, de tal modo que, indica-se o uso dessas análises para avaliar efeitos deletérios em organismos não-alvo (RODRIGUES et al. 2017, 2019)

2.5 Uso da fitorremediação para o tratamento de águas contaminadas por antibióticos

Os métodos convencionais de tratamento de água e esgoto não conseguem realizar a remoção completa de contaminantes (MUSTAFA et al., 2020). Alguns dos tratamentos envolvem troca iônica, osmose reversa, precipitação química, cloração, adsorção e ozonização. Alguns estudos demonstram que o carvão ativado possui uma capacidade de eliminar os antibióticos que variam entre 49% a 99%, e a ozonização possui uma eficácia que varia de 10-95% (KAF AEI et al., 2018).

Visto que, a presença de contaminantes, como os antibióticos podem acarretar em efeitos adversos a diferentes organismos não-alvo, faz-se necessário a busca por tratamentos alternativos para a sua remoção dos corpos hídricos. Dentre os tratamentos biológicos alternativos, destaca-se a fitorremediação. Esta técnica biorremediadora, consiste no uso de plantas para a degradação e/ou acumulação de contaminantes, sendo considerado um método de baixo custo e elevada eficiência. A vantagem do uso de plantas aquáticas (macrófitas aquáticas) é devido ao elevado potencial de absorção de nutrientes de águas, além de remoção de compostos

orgânicos e inorgânicos, elementos traço e fármacos, como os antibióticos presentes nas águas residuais agrícolas, domésticas e industriais (HU et al., 2020; MUSTAFA; HAYDER, 2020).

Alguns estudos demonstram a eficiência de macrófitas aquáticas para a fitorremediação de antibióticos. Gomes et al. (2020a) verificaram que a macrófita *Lemna minor* apresenta potencial fitorremediador para enrofloxacina, oxitetraciclina e amoxicilina. Hu et al. (2020), citam que macrófitas como *Pteris vittata*, *Myriophyllum aquaticum* e *Lemna minor* podem remover antibióticos, como tetraciclina e oxitetraciclina. Dentre as espécies de macrófitas, *Salvinia molesta*, tem sido utilizada no tratamento de águas residuais agrícolas, domésticas e industriais. Essa espécie é recomendada em tratamentos por fitorremediação, devido ao rápido e fácil desenvolvimento em ambientes contaminados, elevado potencial de bioacumulação e apresentam potenciais de uso de sua biomassa (MUSTAFA; HAYDER, 2020). Entretanto, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para a aplicação para a remediação de antibióticos. Desta forma, essa espécie de macrófita aquática apresenta características fisiológicas importantes que podem corroborar para a avaliação do potencial fitorremediador desta espécie para diferentes contaminantes emergentes, como a CIP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e aclimação dos peixes

O projeto foi enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPR (CEUA) e aprovado sob o N° 1227/2018. Foram utilizados peixes juvenis da espécie *Rhamdia quelen* (peso de 10.50 g \pm 2.14 g e medindo 10.95 cm \pm 1.09 cm) (Figura 4). Os animais foram mantidos em aquários para aclimação por 120 dias, com condições controladas com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, aeração constante e temperatura da água de 25 \pm 2 °C. A alimentação com ração (Laguna®, 32% de proteína) foi realizada diariamente. Após a aclimação dos peixes, foi realizado o bioensaio.



Figura 4. Peixe da espécie *Rhamdia quelen*.

Fonte: Kitamura (2020)

3.2 Obtenção e aclimação das macrófitas

Para realizar a fitorremediação da água, foram utilizados exemplares de *Salvinia molesta* coletadas no Parque Barigui, Curitiba-PR. As macrófitas (Figura 5) estavam em processo de aclimação sob condições controladas de temperatura e

fotoperíodo e foram cultivadas no laboratório de Toxicologia Ambiental para a sua depuração.



Figura 5. Exemplares de *Salvinia molesta*

Fonte: Kitamura (2020)

3.3 Desenvolvimento do bioensaio

Após o período de aclimação, os peixes foram expostos durante 96 horas a duas concentrações de CIP, baseadas em concentrações encontradas no meio ambiente de acordo com a literatura (FRADE et al., 2014; JANECKO et al., 2016; MUTIYAR; MITTAR, 2014; RIAZ et al., 2017). As concentrações foram: 0 (Controle), 1, 10 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de ciprofloxacina. Para testar a eficiência da fitorremediação para uma possível redução dos efeitos de toxicidade, foi realizado o tratamento da água por um período de 96 horas, utilizando a densidade de 5 g.L^{-1} de *Salvinia molesta*, sob condições de temperatura e na presença de 0 (Fito Controle), 1 (Fito 1) e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fito 10) de ciprofloxacina. A água pós-tratada com a *S. molesta* foi utilizada para a exposição dos peixes. O bioensaio foi estático e agudo, com duração de 96 horas (OECD, 2012). Os experimentos foram realizados em aquários de 15 litros, sendo calculada a proporção de 1 g de peixe L^{-1} . Para cada tratamento foram utilizados 16 animais por grupo (Fig. 6).

Os parâmetros da água se mantiveram estáveis durante todo o bioensaio: oxigênio dissolvido ($11,0 \pm 0.86 \text{ mg.L}^{-1}$), amônia ($9.5 \pm 0.86 \text{ mg.L}^{-1}$) e pH (7.22 ± 0.10) foram analisados ao longo do experimento. No último dia experimental, os peixes

foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$). Posteriormente foi coletado aproximadamente $500 \mu\text{L}$ de sangue com seringas heparinizadas da veia caudal. Para as análises de genotoxicidade, o sangue ($50\mu\text{L}$) foi colocado em soro bovino fetal e, para as análises hematológicas, o restante do sangue foi armazenado em tubos do tipo eppendorf (2mL).

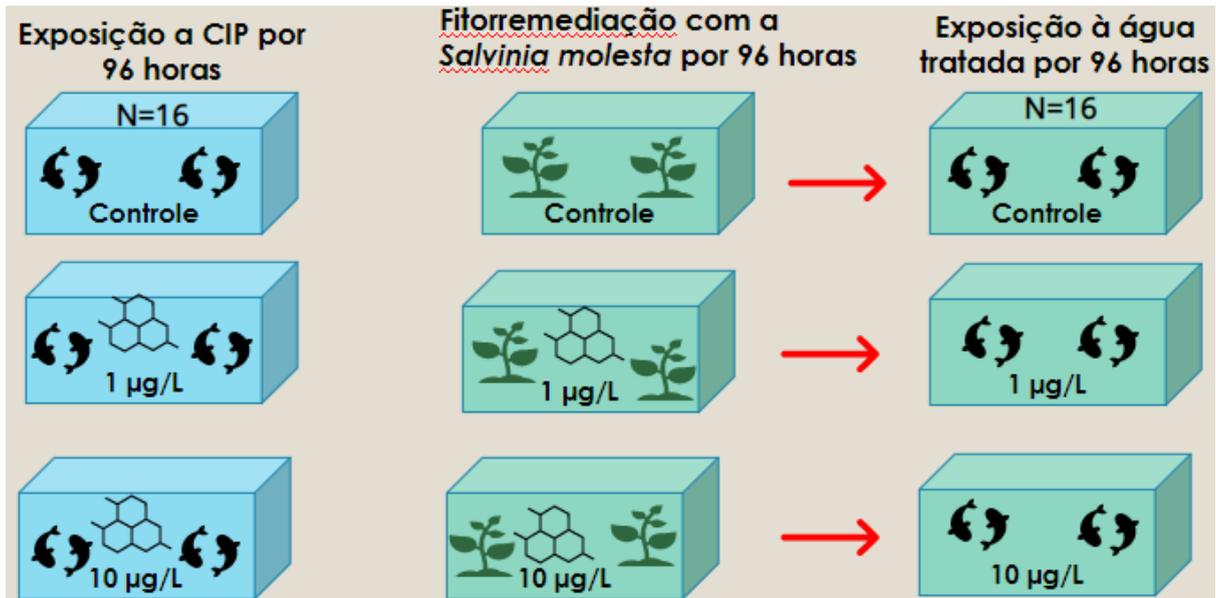


Figura 6. Desenho do bioensaio
Fonte: Bitencourt (2021)

3.4 Avaliação de Biomarcadores de genotoxicidade

As amostras de sangue coletadas ficaram armazenadas em soro bovino fetal por 2 horas. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ foram diluídas em $120\mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão e, espalhadas em lâminas cobertas com agarose ultrapura (Fig. 7). As lâminas foram processadas e coradas conforme a técnica descrita por Speit & Hartmann (1999), com modificações realizadas por Cestari et al. (2004) para análises por ensaio cometa. Após a coloração, foram analisados 100 nucleoides e a avaliação foi realizada conforme (Fig. 8). Tais análises foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Mutagênese e Citogenética Ambiental, no Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

ENSAIO DO COMETA

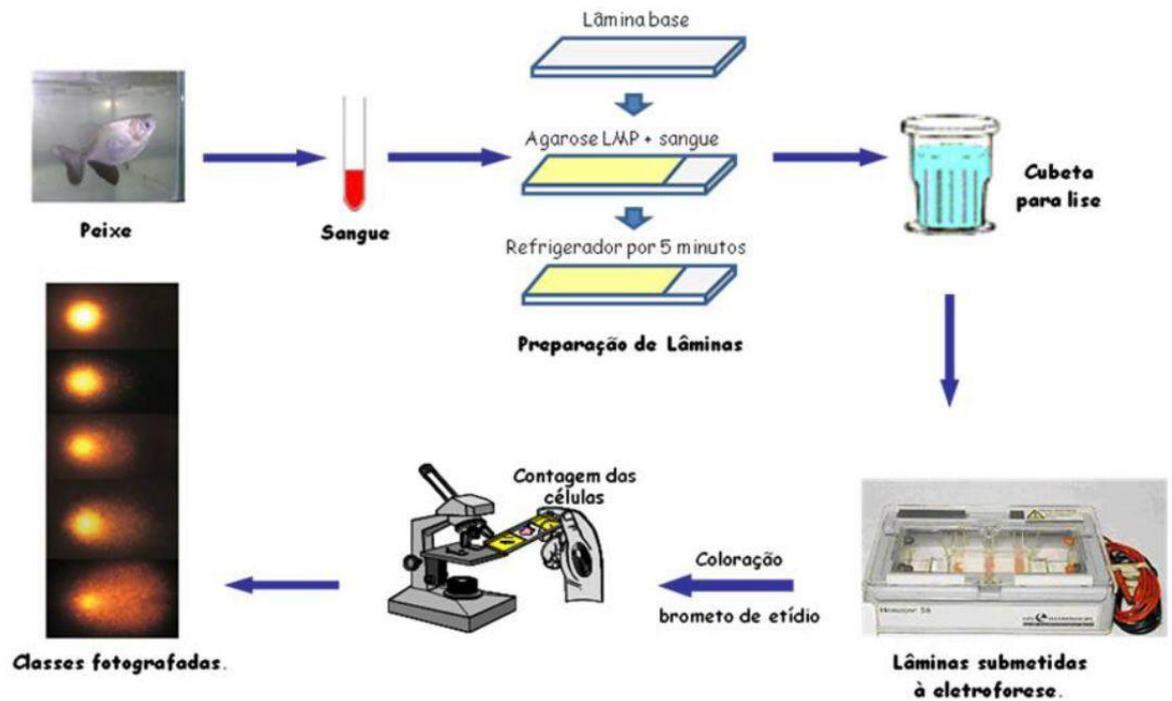


Figura 7. Método de preparo do ensaio cometa (ROCHA, 2011).

Imagem Observada	Cauda/Cabeça	Classes de Danos
	sem cauda	0
	≤1	1
	1 – 2	2
	≥2	3
	sem cabeça	4

Figura 8. Método de avaliação do ensaio cometa conhecido como Score (VILLELA et al., 2006)

3.5 Avaliação de Biomarcadores Hematológicos

Dentre os biomarcadores hematológicos, foram analisados os seguintes parâmetros: contagem do número total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, dosagem da concentração de hemoglobina e hematócrito.

3.5.1 Contagem do número total de eritrócitos

Para a contagem de eritrócitos (et), 10µL de sangue foram diluídos em 2 mL de formol citrato e, posteriormente, foi realizada a contagem das células na Câmara de Neubauer. A quantificação de eritrócitos foi realizada, conforme a equação 3 (OLIVEIRA-JUNIOR et al.,2009).

$$Y = X_c \cdot FD \cdot 1,6 \cdot 10^5 \quad (3)$$

Em que: X_c é o valor de hemácias contadas na câmara e FD é o fator de diluição.

3.5.2 Dosagem de hemoglobina

A dosagem da hemoglobina (Hb) foi realizada conforme o método de cianometahemoglobina. Para tanto, foram adicionados 20 µL de sangue em 5 mL de reagente de Drabkin. Durante esta técnica, os compostos de Hb são convertidos em cianometahemoglobina quando entram em contato com o reagente de Drabkin), o que permitiu a realização da leitura em espectrofotômetro (540 nm). A concentração de hemoglobina foi calculada, conforme a equação 4 (COLLIER, 1944; DRABKIN, 1946):

$$\text{Absorbância} \times \text{fator de calibração} = \text{g/dL Hb no sangue total} \quad (4)$$

3.5.3 Hematócrito

Para a análise de hematócrito (Ht), foi realizado o preenchimento de um tubo do tipo capilar com o sangue retirado após a coleta. Posteriormente, os capilares foram colocados em uma microcentrífuga a 12.000 rpm, por 5 minutos. Após a centrifugação das amostras foi mensurado o volume ocupado pelos glóbulos

vermelhos em relação ao sangue total e, posteriormente, foi calculado o valor do hematócrito, dado em porcentagem (HINE, 1992).

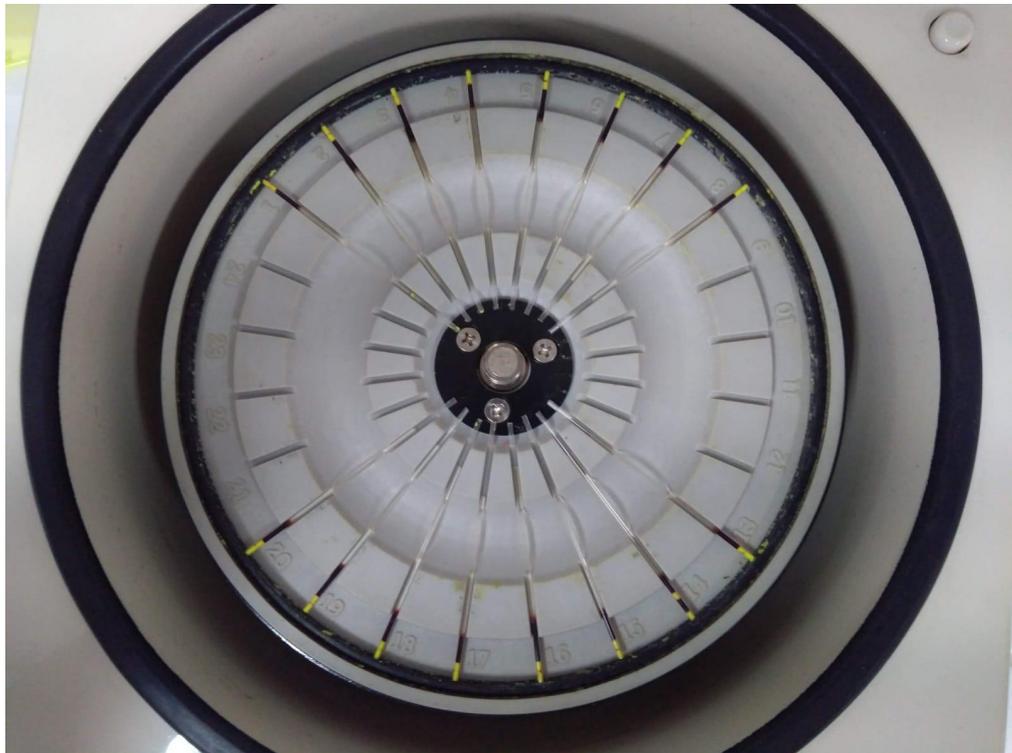


Figura 9. Microcentrífuga com microcapilares para a realização do hematócrito
Bitencourt (2021)

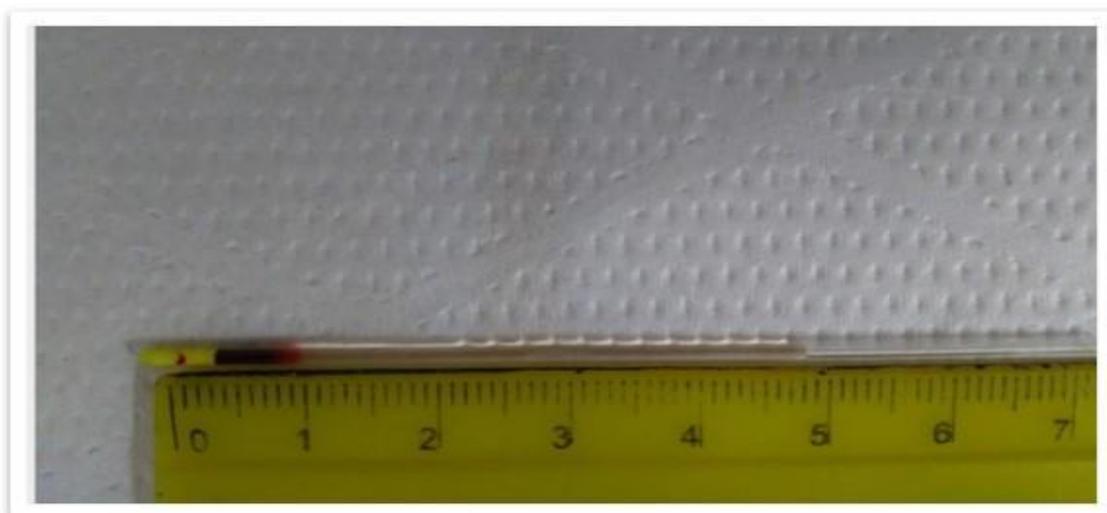


Figura 10. Hematócrito
Bitencourt (2021)

3.5.4 Determinação do número total de leucócitos e trombócitos

Durante a coleta do sangue, foram realizadas extensões sanguíneas. Posteriormente, foi realizada a coloração de May-Grunwald- Giemsa Wrigth segundo Tavares-Dias e Moraes (2004). Após a coloração, foi realizada a contagem do número total de leucócitos e trombócitos em microscópio óptico.

3.6 Análise de dados

Os dados foram analisados conforme a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Para dados paramétricos, foi feita a análise por ANOVA seguido pelo teste de Tukey (biomarcadores hematológicos). Os dados foram expressos em média e erro padrão. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (biomarcadores de genotoxicidade) e os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil , considerando valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genotoxicidade em sangue de peixes *R. quelen*

Peixes *R. quelen* expostos às concentrações de CIP (1 e 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$) apresentaram aumento de danos no DNA pelo ensaio cometa, quando comparados ao grupo controle e aos tratamentos pós-fitorremediação com *S. molesta* (Fito Controle, Fito 1 e Fito 10) ($P < 0,0001$; Fig. 5). Ao comparar os tratamentos pós-fitorremediação com o grupo controle, não foram evidenciadas diferenças significativas ($P > 0,05$; Fig. 5), demonstrando que o tratamento foi eficaz para a redução da genotoxicidade induzida por CIP em sangue de peixes expostos ao antibiótico.

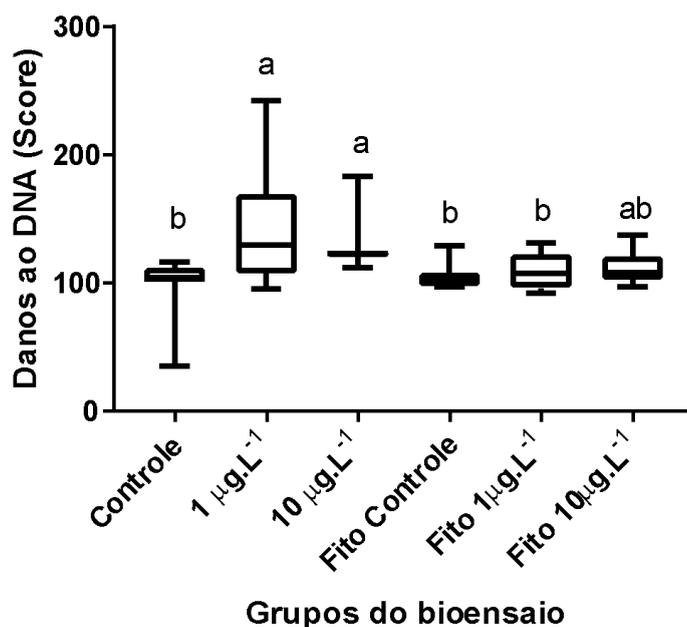


Figura 11. Escore de danos ao DNA (Mediana \pm variação dos interquartis) em sangue de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas a diferentes concentrações de CIP (Controle, 1, 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$) e pós-fitorremediação por *Salvinia molesta* (Fito Controle – controle fitorremediação; Fito 1 – pós-fitorremediação de 1 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$; Fito 10: pós-fitorremediação de 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$) *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Sabe-se que antibióticos pertencentes a classe das fluoroquinolonas atuam na inibição da DNA girase e nas topoisomerases, principalmente II e IV. Tais

enzimas corroboram no processo de replicação celular e na transcrição de DNA de organismos procarióticos (HARTMANN et al. 1999; CHAMPOUX et al. 2001), além de causar interferências diretas na fisiologia dos microrganismos, como a geração de outros danos celulares (Hooper e Jacoby 2016). Entretanto, as topoisomerasas II, podem apresentar a mesma função nos organismos eucarióticos (CHAMOPOUX et al. 2001) e, a exposição a estes antibióticos, pode gerar o aumento da condensação de cromatinas e promover danos na replicação celular (BATTHACARYA et al. 2020). Tais mecanismos, podem ser o principal motivo do surgimento de efeitos adversos a organismos não-alvo (BATTHACARYA et al. 2020), como a geração de danos por genotoxicidade, principalmente provenientes de danos oxidativos no DNA em células eucarióticas (GOOTZ et al., 1990).

4.2 Alterações hematológicas em peixes *R. quelen*

Peixes *R. quelen* quando expostos a diferentes concentrações de CIP (1, 10 $\mu\text{g CIP.L}^{-1}$) apresentaram um decréscimo no número de eritrócitos ($p < 0,0001$; $P < 0,0001$, tabela 1) e na concentração de hematócrito ($p < 0,0001$; $p < 00,001$, Tab. 1). Entretanto, após o pós-tratamento realizado por *S. molesta*, não foram constatadas diferenças significativas no tratamento com Fito Controle, Fito 1 e Fito 10, quando comparados ao controle (Tab. 1). Não foram observados efeitos adversos na concentração de hemoglobina ($p > 0,05$).

Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações de CIP (Controle, 1, 10 $\mu\text{g.CIP.l}^{-1}$) e os efeitos do pós-tratamento utilizando *Salvinia molesta* (Fito Controle, Fito 1, Fito 10) em biomarcadores hematológicos de *Rhamdia quelen*. Os valores estão representados por média \pm erro padrão.

Tratamentos	Hematócrito (%)	Eritrócitos (células.dL ⁻¹)	Hemoglobina (mg.L ⁻¹)
Controle	31.74 \pm 0.67 ^a	5.34 \pm 0.22 ^a	2.68 \pm 0.26 ^a
1	23.53 \pm 1.29b ^{***}	2.78 \pm 0.19b ^{***}	2.57 \pm 0.22 ^a
10	26.18 \pm 1.35b ^{***}	2.67 \pm 0.09b ^{***}	2.84 \pm 0.18 ^a
Fito C	30.16 \pm 0.38 ^a	5.81 \pm 0.17 ^a	2.93 \pm 0.27 ^a
Fito 1	30.56 \pm 0.68 ^a	5.861 \pm 0.17 ^a	2.62 \pm 0.28 ^a
Fito 10	30.16 \pm 0.65 ^a	5.71 \pm 0.20 ^a	2.48 \pm 0.27 ^a

Fito Controle: Tratamento controle com *S. molesta*; Fito1: tratamento pós-fitorremediação de 1 $\mu\text{g CIP.L}^{-1}$ utilizando *S. molesta*; Fito10: tratamento pós-fitorremediação de 10 $\mu\text{g CIP.L}^{-1}$ utilizando *S. molesta*. * Significância $p < 0.05$; ** significância $p < 0.01$; *** significância $p < 0.001$. Médias \pm erro

padrão. Valores seguidos de letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste anova-one-way seguido pelo teste de Tukey

Em exposição a 1 e 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$, os peixes apresentaram redução no número de leucócitos ($p < 0,001$, Fig. 6A), e trombócitos totais ($p < 0,001$, Fig. 6B), quando comparados ao grupo controle e com os tratamentos do processo pós-fitorremediação (Fito Controle, Fito 1 e Fito 10). Não foram constatadas diferenças significativas no tratamento com Fito Controle, Fito 1 e Fito 10, quando comparados ao controle ($P > 0,05$).

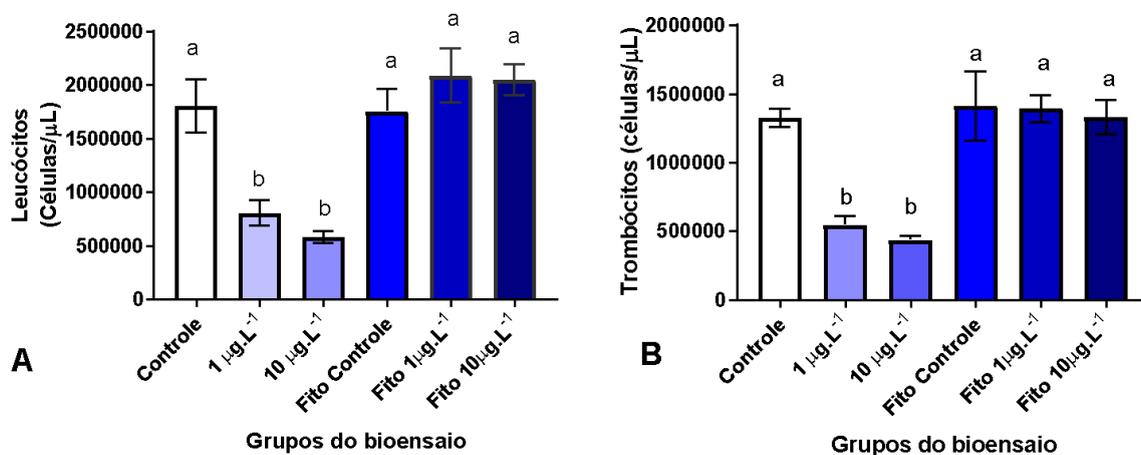


Figura 12. Número de leucócitos (A) e trombócitos totais (B) (Média \pm erro padrão) em sangue de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas a diferentes concentrações de CIP (Controle, 1, 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$) e pós-fitorremediação por *Salvinia molesta* (Fito Controle – controle fitorremediação; Fito 1 – pós-fitorremediação de 1 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$; Fito 10: pós-fitorremediação de 10 $\mu\text{g.CIP.L}^{-1}$) *Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Anova one-way, seguido pelo teste de Tukey.

A exposição à CIP ocasionou redução dos parâmetros hematológicos, principalmente relacionados à série vermelha sanguínea e do número de células de defesa. Corroborando com os resultados obtidos, a redução no número de hemácias e no valor do hematócrito já foram evidenciadas para o *dogfish Scyliorhinus canícula* após à aplicação intramuscular de enrofloxacina (fluoroquinolona) (ZACARONI et al., 2017). Outros antibióticos, como o cloranfenicol, já ocasionaram a redução de número de hemácias, volume corpuscular médio, bem como da concentração de hemoglobina em peixes da espécie *Clarias gariepinus* (bagre) (NWANI et al., 2014). Segundo Nwani et al. (2014), a redução de tais parâmetros afeta diretamente na

saúde dos peixes, principalmente pela redução do transporte de oxigênio, ocasionando o surgimento de possíveis quadros de anemia. Ramesh et al. (2018) observaram a redução da concentração de hematócrito para a espécie *Cirrhinus mrigala* expostos por sete dias ao antibiótico sulfametaxazina, e, citam que a redução deste parâmetro indica quadros de anemia para os peixes, visto que há maior diluição dos eritrócitos na corrente sanguínea.

Os parâmetros hematológicos podem trazer informações importantes acerca da saúde de peixes após a exposição a antibióticos. As reduções no número de eritrócitos podem ser decorrentes da liberação de eritrócitos imaturos. Tal situação pode gerar quadros de anemia, principalmente quando há a liberação de eritrócitos imaturos. Ainda, pode ocorrer a supressão de tecidos eritropoiéticos, o que pode afetar diretamente a saúde dos animais, como peixes (LIMBU, 2020). A redução desses parâmetros hematológicos (células de defesa, concentração de hematócrito e eritrócitos) podem apresentar efeitos deletérios para a saúde dos animais. Tais condições podem ser originadas por danos teciduais e supressão da imunidade, podendo eventualmente, ocasionar resultados fatais (LIMBU, 2020). Estas informações podem ainda corroborar com os resultados obtidos, visto que no presente trabalho foi constatada genotoxicidade para o sangue, independente da concentração testada. A redução das células sanguíneas pode estar relacionada ao efeito adverso causado pelas fluoroquinolonas, pois, conforme Hooper e Jacoby (2016), essa classe de antibióticos pode interferir no processo de transcrição e replicação do DNA e afetar a duplicação do material genético. Diante disso, possivelmente pode ocorrer liberação de eritrócitos danificados ou menores números de células maduras.

Sabe-se que a redução do número de eritrócitos e da concentração de hematócrito podem ser indicativos de anemia (NWANI et al. 2014; RAMESH et al. 2018). Desta forma, tais efeitos podem acarretar na redução do transporte de oxigênio (NWANI et al. 2014; RAMESH et al. 2018), resultando em uma insuficiência na demanda metabólica dos tecidos, prejudicando a saúde dos peixes. Entretanto, após a fitorremediação, tais efeitos lesivos não foram mais observados.

O tratamento por fitorremediação corroborou para a redução dos efeitos de toxicidade causados pela CIP. Tais resultados são de interesse dentro da área de

toxicologia ambiental, visto que, poucos estudos demonstram contribuição desta técnica para a redução da toxicidade em organismos aquáticos, quando expostos a antibióticos. Corroborando com os resultados observados no presente trabalho, Bauer et al. (2020) verificaram que após o uso de macrófitas aquáticas em um sistema de *wetlands* para o tratamento de esgoto doméstico, ocorreu a remoção dos contaminantes orgânicos, bem como, a redução de toxicidade em peixes *Danio rerio*. Desta forma, foi demonstrado que esse tipo de tratamento é eficiente para tratar águas contaminadas e pode reduzir os possíveis efeitos adversos em organismos aquáticos.

Estudos com macrófitas aquáticas têm demonstrado eficiência para a remoção de diferentes contaminantes, como os antibióticos (GOMES et al. 2020a; ROCHA et al. 2021). Desta forma, realizar estudos que comprovem a redução de efeitos de toxicidade ressaltam a eficiência de aplicação da fitorremediação como técnica de tratamento. Kitamura et al. (2020) já evidenciou, em um estudo prévio, que *S. molesta* pode remover de 63 a 93% de ciprofloxacina de águas contaminadas, o que pode corroborar a redução de efeitos subletais em parâmetros hematológicos e de genotoxicidade em *R. quelen*. Diante disso, os resultados do presente trabalho podem contribuir para a valorização da técnica de fitorremediação como forma de mitigação de impactos causados a ambientes contaminados por antibióticos, como a ciprofloxacina.

5. CONCLUSÃO

A ciprofloxacina ocasionou alterações hematológicas em peixes *R. quelen*. A redução de eritrócitos e a concentração de hematócrito podem ser indícios de quadros de anemia nos peixes. Além disso, houve a diminuição do número de leucócitos e trombócitos, o que pode indicar início de processos de imunossupressão.

Ainda, foram observados danos de genotoxicidade em eritrócitos dos peixes, demonstrando que mesmo em concentrações ambientais, CIP pode ocasionar danos em parâmetros hematológicos. Tais efeitos evidenciam que, mesmo em exposições de curta duração, este antibiótico pode causar efeitos adversos em peixes.

Contudo, após comparar os resultados obtidos da fase de toxicidade com o pós-tratamento por fitorremediação, pode-se constatar que o tratamento foi eficiente para a mitigação de alterações hematológicas e de genotoxicidade. Diante disso, foi verificado que *S. molesta* foi eficiente para a redução dos efeitos subletais nos peixes e é uma alternativa viável para a mitigação de impactos causados a ambientes contaminados por antibióticos.

Sugere-se que em futuros estudos, sejam realizadas análises de quantificação química na água para ser realizado o cálculo de eficiência do tratamento de fitorremediação. Além disso, sugere-se a avaliação da eficiência desta técnica de remediação para mitigar impactos causados em múltiplos biomarcadores de demais tecidos de peixes *R. quelen*.

REFERÊNCIAS

- AUTHMAN, M. M.N. et al. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2015.
- BAUER, L. H. et al. Floating treatment wetland for nutrient removal and acute ecotoxicity improvement of untreated urban wastewater. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-14, 2021
- BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, S.; MANDAL, S. M. Fluoroquinolone antibiotics show genotoxic effect through DNA-binding and oxidative damage. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 227, p. 117634, 2020.
- CASTRO, J. S. et al. Histopathological and hematological biomarkers in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) from an environmental protection area of Maranhão, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 14, n. 1, 2019.
- CESTARI, M.M. et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 270-274, 2004.
- CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 369-413, 2001.
- CHEN, G.; LI, M.; LIU, X.. Fluoroquinolone antibacterial agent contaminants in soil/groundwater: a literature review of sources, fate, and occurrence. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 1-11, 2015.
- CHEN, H.; GAO, B.; LI, H. Removal of sulfamethoxazole and ciprofloxacin from aqueous solutions by graphene oxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 201-207, 2015.
- CHEN, H. et al. Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 140-148, 2018.
- COLLIER, H. B. Standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550, 1944.
- COUTO R. Bactérias Multirresistentes em COUTO RC; PEDROSA TMG; NOGUEIRA JM, editora. **Infecção Hospitalar e outras Complicações não Infeciosas da Doença**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. P. 577-88

DRABKIN, D. L. Spectrophotometric studies: XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, n. 2, p. 703-723, 1946.

E ETIM, E.; E MBAKARA, I. Phytoremediation of water bodies. **Current Environmental Engineering**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2017.

EZELARAB, H. AA et al. Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. **Archiv Der Pharmazie**, v. 351, n. 9, p. 1800141, 2018.

FAILACE, R. **Hemograma, Manual de Interpretação**. 4a edição, Porto Alegre: Artmed. 2006.

FISHER, L. M. et al. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones: new concepts on the mechanism of action and resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 87, n. 5, p. S2-S8, 1989.

FRADE, V.M. F. et al. Environmental contamination by fluoroquinolones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 41-54, 2014.

GOMES, M. P. et al. Emerging contaminants in water used for maize irrigation: Economic and food safety losses associated with ciprofloxacin and glyphosate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, p. 110549, 2020a.

GOMES, M. P. et al. Individual and combined effects of amoxicillin, enrofloxacin, and oxytetracycline on *Lemna minor* physiology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111025, 2020b.

GOOTZ, T. D. et al. Selective toxicity: the activities of 4-quinolones against eukaryotic DNA topoisomerases. In: **The 4-Quinolones: Anti Bacterial Agents in Vitro**. Springer, London, 1990. p. 159-172.

GUILOSKI, I. C. et al. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 291-300, 2017a.

GUILOSKI, I. C. et al. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 111-120, 2017b.

HARTMANN, A. et al. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 36, n. 2, p. 115-119, 1999.

HERBOLD, Bernd A.; BRENDLER-SCHWAAB, Susanne Y.; AHR, Hans Jürgen. Ciprofloxacin: in vivo genotoxicity studies. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1-2, p. 193-205, 2001.

HINE PM. 1992. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunology**, vol. 2, p. 79-98.

HU, H. et al. Sustainable livestock wastewater treatment via phytoremediation: Current status and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123809, 2020.

HUSSAIN, B.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; MASOUD, M. S.; AHMED, Z.; MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 393–398, 2017.

IGWEGBE, C. A. et al. Adsorption of ciprofloxacin from water: a comprehensive review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2020.

JANECKO, Nicol et al. Implications of fluoroquinolone contamination for the aquatic environment—A review. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 35, n. 11, p. 2647-2656, 2016.

KAF AEI, R. et al. Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 703-712, 2018.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J. H.; VAN GENT, D. C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 1989, p. 483–489, 1998.

KITAMURA, R. S. A. et al. *Salvinia Molesta* for Ciprofloxacin Remediation: Physiological Effects and Plant-Reclamation Capacity. In: **SETAC North America 41st Annual Meeting, 2020. SETAC North America 41st Annual Meeting**, . v. 41. p. 0-0, 2020.

KUMAR, P.; SOORAMBAIL K., S.; HARISINGH, S. B.; D’COSTA, A.; CHANDRA, C. R. 106 The effect of gamma radiation on the common carp (*Cyprinus carpio*): In vivo genotoxicity assessment with the micronucleus and comet assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 792, p. 19–25, 2015.

LIU, L. et al. Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. **Acta Ecologica Sinica**, v. 38, n. 1, p. 36-41, 2018.

LINS, J. P. N. et al. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MATHIAS, F. T. Avaliação dos efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes do ibuprofeno no peixe neotropical *Rhamdia quelen*, 2018.

MUSTAFA, H. M.; HAYDER, G.. Recent studies on applications of aquatic weed plants in phytoremediation of wastewater: A review article. **Ain Shams Engineering Journal**, 2020.

MUTIYAR, P.K.; MITTAL, A. K. Risk assessment of antibiotic residues in different water matrices in India: key issues and challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7723-7736, 2014.

NOGUEIRA, A. F. et al. Embryonic development, locomotor behavior, biochemical, and epigenetic effects of the pharmaceutical drugs paracetamol and ciprofloxacin in larvae and embryos of *Danio rerio* when exposed to environmental realistic levels of both drugs. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 11, p. 1177-1190, 2019.

NWANI, C. D. et al. Changes in behavior and hematological parameters of freshwater African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) following sublethal exposure to chloramphenicol. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 107-113, 2014.

OLIVEIRA-JUNIOR, A. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 146-151, 2009.

RAMESH, M. et al. Antioxidant status, biochemical, and hematological responses in a cultivable fish *Cirrhinus mrigala* exposed to an aquaculture antibiotic Sulfamethazine. **Aquaculture**, v. 491, p. 10-19, 2018.

RIAZ, L. et al. Industrial release of fluoroquinolones (FQs) in the waste water bodies with their associated ecological risk in Pakistan. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 52, p. 14-20, 2017.

ROCHA, C. Excertos da Tese: Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio em duas espécies de peixes neotropicais. Bio Rocha, 10 de setembro de 2011. Disponível em:
<http://biorocha.blogspot.com/2011/09/excertos-da-tese-avaliacao-da.html>. Acesso em : 15/12/21

ROCHA, C. S. et al. Evaluating aquatic macrophytes for removing erythromycin from contaminated water: floating or submerged?. **International Journal of Phytoremediation**, p. 1-9, 2021.

RODRIGUES, S et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pro-oxidant and genotoxic responses following acute and chronic exposure to the antibiotic oxytetracycline. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 104-117, 2017.

RODRIGUES, Sara et al. Assessment of toxic effects of the antibiotic erythromycin on the marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by a multi-biomarker approach. **Chemosphere**, v. 216, p. 234-247, 2019.

SANDERS, C. C. Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 516-527, 1988.

TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 423- 431, 1999.

TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.

VILLELA, I. V. et al. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, 2006.

WISE, R. Antimicrobial resistance: priorities for action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 585-586, 2002.

XU, J. et al. Distribution, sources and composition of antibiotics in sediment, overlying water and pore water from Taihu Lake, China. **Science of the Total Environment**, v. 497, p. 267-273, 2014.

YAN, Y. et al. Ecotoxicological effects and accumulation of ciprofloxacin in *Eichhornia crassipes* under hydroponic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 29, p. 30348-30355, 2019.

YAN, Y. et al. Migration of antibiotic ciprofloxacin during phytoremediation of contaminated water and identification of transformation products. **Aquatic Toxicology**, v. 219, p. 105374, 2020.

YANCHEVA, V. et al. Fish in Ecotoxicological Studies. **Ecologia Balkanica**, v. 7, n. 1, 2015.

YANG, C.; SONG, G.; LIM, W. A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, p. 108840, 2020.

ZHENG, C. et al. Structural design of magnetic biosorbents for the removal of ciprofloxacin from water. **Bioresource Technology**, v. 296, p. 122288, 2020.

ZIVNA, D. et al. The effects of ciprofloxacin on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 1733-1740, 2016. Viva a Ciência