

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISSANDRA TRAVASSOS DE FREITAS

**EFEITO DE ANTIBIÓTICOS EM CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS SOBRE  
IMATUROS DE *Chironomus sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981  
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE)**

CURITIBA

2023

LISSANDRA TRAVASSOS DE FREITAS

**EFEITO DE ANTIBIÓTICOS EM CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS SOBRE  
IMATUROS DE *Chironomus Sancticaroli* STRIXINO & STRIXINO, 1981  
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2023

Dedico este trabalho a meus pais, Maria Travassos de Freitas e Sebastião de Freitas Filho, por todo amor, carinho e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, Maria e Sebastião por sempre estarem ao meu lado, pelo incentivo e esforço dedicado à minha educação.

As minhas irmãs, Pamela e especialmente Lorena que me apoiou muito e deu forças na etapa final.

A minha amiga de graduação Angela Arce Gomes e a todos os colegas do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae (LAMFIC<sup>2</sup>).

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva e ao Dr. Vinícius Sobrinho Richardi.

.

Com carinho!

Lissandra

“De nada tenho certeza, mas a visão das estrelas me faz sonhar.”  
(Vincent Van Gogh)

## RESUMO

A ciprofloxacina é um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de amplo espectro de doenças infecciosas em humanos e animais, como consequência está presente em diferentes compartimentos como solo e ecossistemas aquáticos. Com uma metabolização incompleta pelos organismos, tratamento ineficiente e eliminação inadequada é largamente encontrada no ambiente aquático, entretanto estudos sobre sua toxicidade em *Chironomus sancticaroli* é ausente. Os Chironomidae são uma família de insetos de fundamental importância na cadeia trófica nos ecossistemas de água doce, com importante papel ecológico e bioindicadores de contaminação por substâncias tóxicas em diferentes níveis da organização biológica. O presente estudo, utilizando múltiplos biomarcadores, avaliou os efeitos subletais da exposição subcrônica (11 dias), às concentrações ambientalmente relevantes (1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da ciprofloxacina (CIP) em *Chironomus sancticaroli*. Foi investigada a atividade da acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e esterase beta (EST- $\beta$ ) e da catalase (CAT), além da expressão gênica da hemoglobina B (HbB). A AChE não apresentou alteração em relação ao controle, as esterases EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  mostraram aumento significativo da atividade na concentração de 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CP enquanto a CAT apresentou sua atividade aumentada em ambas as concentrações de CIP. A expressão da HbB foi sensível a CIP apresentando uma redução significativa em ambas as concentrações em relação ao controle. Os resultados indicaram uma ação tóxica e possível pró-oxidante da CIP sobre *C. sancticaroli* e a necessidade da realização de estudos adicionais dos efeitos deste antibiótico em *C. sancticaroli*, visando o estabelecimento de medidas preventivas mais efetivas quanto à liberação desta substância no meio ambiente.

Palavras-chave: *Chironomus*, ciprofloxacina, fármaco, ecossistema aquático.

## ABSTRACT

Ciprofloxacin is an antibiotic widely used in humans and animals with great effectiveness for a wide variety of infections, due to the increase in population, easy access and increased demand for animal protein. With an incomplete metabolization by the organisms, inefficient treatment and inadequate elimination it is widely found in the aquatic environment, however studies on its toxicity in *Chironomus sancticaroli* are lacking. The Chironomidae are a family of insects of fundamental importance in the food chain, with an important ecological role and bioindicators of contamination by toxic substances at different levels of biological organization. The present study, using multiple biomarkers, evaluated the sublethal effects of subchronic (11 days) exposure to environmentally relevant concentrations (1.3 and 2.9  $\mu\text{g/L}^{-1}$ ) of ciprofloxacin (CIP) in *Chironomus sancticaroli*. The enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE), esterase alpha (EST- $\alpha$ ) and esterase beta (EST- $\beta$ ) and catalase (CAT) was investigated, in addition to the gene expression of the molecular biomarker hemoglobin B (HbB). The expression of the HbB gene was sensitive to CIP showing a significant reduction in both concentrations in relation to the control. In the biochemical assay, AChE did not change in relation to the control, EST- $\alpha$  and EST- $\beta$  esterases showed a significant increase in activity at the concentration of 2.9  $\mu\text{g/L}^{-1}$  CP, while CAT showed increased activity in both concentrations of CIP. The results indicated a toxic and possible pro-oxidant action of CIP on *C. sancticaroli* and the need for further studies of the effects of this antibiotic on this important organism of the aquatic ecosystem, in addition to the need for more effective preventive measures regarding the release of this substance in the environment.

Keywords: *Chironomus*, ciprofloxacin, pharmaceutical, aquatic ecosystem.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> – (1) Massa ovígera (2) Larva de primeiro ínstar (3) Larva de quarto ínstar (4) Pupa (5) Macho adulto (6) Fêmea adulto.....	21
Figura 2: Representação da sinapse colinérgica na presença da acetilcolinesterase e na ausência.....	25
Figura 3: Esquema das vias de origem da contaminação do ecossistema aquático.	30
Figura 4: Gerações da Quinolona. ....	33
Figura 5: Estrutura da Ciprofloxacina. ....	34
Figura 6: Criação do <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	37
Figura 7: Aquários de vidro do bioensaio. ....	38
Figura 8: Bioensaio subcrônico: Aquários de vidro cobertos com plástico filme e bomba de aeração. ....	39
Figura 9: Expressão gênica da hemoglobina B (HbB). (CT) Controle, (1,3) e (2,9) concentrações em µg/l de ciprofloxacina. ....	44
Figura 10: Resíduos indicando a normalidade das amostras.....	44
Figura 11: Atividade da AChE: (CT) Controle, (1,3) e (2,9). Concentrações em µg/l de ciprofloxacina. ....	466
Figura 12: Gráfico de resíduos da AChE indicando a normalidade das amostras. .	466
Figura 13: Atividade das EST-α e EST-β: (CT) Controle, (1,3) e (2,9). Concentrações em µg/l de ciprofloxacina. ....	47
Figura 14: Gráfico de resíduos da EST-α indicando a normalidade das amostras. .	477
Figura 15: Gráfico de resíduos da EST-β indicando a normalidade das amostras. ..	48
Figura 16: Atividade da CAT: (CT) Controle, (1,3) e (2,9) concentrações em µg/l de ciprofloxacina. ....	49



## LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ARB	Bactéria resistente a antibiótico
ARG	Gene de resistência a antibiótico
ATC	Iodetoacitilticolina
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BSA	Albumina soro bovina
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CIP	Ciprofloxacina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
DZUP	Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETE	Estação de tratamento de efluente
ETA	Estação de tratamento de água
EST- $\alpha$	Esterase alfa
EST- $\beta$	Esterase beta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FQ	Fluorquinolona
GR	Glutathione redutase
GST	Glutathione S-transferase
GSH	Glutathione reduzida
Hb	Hemoglobinas
HbB	Hemoglobina B
HbA	Hemoglobina A

HSP	Proteína de choque térmico
LAMFIC <sup>2</sup>	Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
LPO	Peroxidação lipídica
MAPEG	<i>Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor
®	Marca registrada
°C	Graus celsius
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
g	Grama
h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
L	Litro
M	Molar
min	Minutos
mg	Miligrama
mg L <sup>-1</sup>	Miligrama por litro
mg ml <sup>-1</sup>	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
nmol	Nanomolar
O <sup>2</sup>	Oxigênio
s	Segundos
μM	Micromolar
μg	Micrograma
μg/l	Micrograma por litro
μL	Microlitros
μs mol <sup>-1</sup>	Unidade de condutividade
x	Vezes

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
3.1 <i>CHIRONOMIDAE - CHIRONOMUS SANCTICAROLI</i> .....	19
3.2 BIOMARCADORES .....	22
3.2.1 Acetilcolinesterase (AChE).....	24
3.2.2 Esterase alfa (EST- $\alpha$ ), Esterase beta (EST- $\beta$ ) .....	26
3.2.3 Catalase (CAT).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.3 AMBIENTE AQUÁTICO E A CIPROFLOXACINA .....	288
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>377</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E CRIAÇÃO CHIRONOMIDAE.....	377
4.2 BIOENSAIO DE TOXICIDADE .....	388
4.3 ENSAIO MOLECULAR.....	400
4.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	411
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>433</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>511</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>522</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os Chironomidae (Diptera) são insetos aquáticos de ampla distribuição e expressivo número de espécies (TRIVINHO-STRIXINO, 2011; ARMITAGE et al., 1995). Em sua forma imatura vivem no sedimento da água doce desempenhando importante papel ecológico, participando do processo de ciclagem de nutrientes e atuando como elo fundamental da cadeia trófica no ecossistema aquático (PORINCHU; MACDONALD, 2003). Desta forma, eles modificam as propriedades físico-químicas do sedimento e da água assegurando e beneficiando a riqueza da cadeia alimentar (DORNFELD et al., 2019).

Por sua importância ecológica e relevantes características como: ciclo de vida curto, facilidade de cultivo em laboratório, riqueza de espécies, presença de hemoglobina (Hb) na hemolinfa e permanência no ambiente aquático passando grande parte de sua vida expostos a poluentes, são valiosos bioindicadores de contaminação da água e do sedimento do ecossistema aquático (AL-SHAMI et al., 2011; RICHARDI et al., 2015; OSPINA-PEREZ et al., 2019).

O ecossistema aquático é um sistema complexo de interação entre o ambiente químico e físico e a biota aquática (AMARAL et al., 2018). E vem sofrendo intenso impacto antrópico com a liberação de diversos poluentes (MARTINS et al., 2014; SILVEIRA, 2004). Dentre eles estão os contaminantes emergentes ou micropoluentes, como os antibióticos e seus subprodutos, que apresentam propriedades de bioatividade, bioacumulação e persistência no ambiente, contaminando as águas superficiais, subterrâneas e os sedimentos, impactando flora e fauna aquática (ARCHANA et al., 2017; EBERT et al., 2011).

Como, por exemplo, as algas e as cianobactérias que tem sua capacidade de realizar fotossíntese, seu sistema antioxidante e seu crescimento afetados, os peixes têm sua função reprodutiva e fisiologia alterados, as bactérias nitrificantes, os microcrustáceos como a *Daphnia magna*, também são impactados, o macroinvertebrado *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera: Chironomidae) que tem seu sistema endócrino e crescimento abalado, assim como, a lentilha d'água (*Lemna minor* L. - Lemnaceae)) que sofre alteração em suas vias respiratórias e na fotossíntese, ou seja, o antibiótico afeta organismos de diferentes níveis tróficos do ecossistema aquático (CARVALHO et al., 2016; GOMES et al., 2017; PARK; KWAK, 2018; YANG et al., 2021a).

Além disso, favorece a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs), que no ambiente são de fácil transmissão disseminando genes de resistência entre os vários compartimentos do ambiente, entre bactérias ambientais e patogênicas, representando um perigo para o homem que pode se deparar com doenças para as quais não tem medicamento eficiente (GAO et al., 2018; RAINYER et al., 2022). Desta forma, a poluição do ecossistema aquático tem consequências tanto para a biota aquática e terrestre quanto para os seres humanos.

Os antibióticos são extensamente utilizados no mundo todo para o tratamento de doenças em seres humanos, animais, em plantas na agricultura e na promoção do crescimento animal na pecuária e aquicultura (YANG et al., 2021b). Portanto suas fontes de origem são diversas como dos efluentes residuais, hospitalares e industriais, da agroindústria, da aquicultura, da pecuária, dos bio sólidos, do descarte inadequado do próprio medicamento e dos lixiviados de aterros sanitários (ANAND et al. 2021; LARSSON et al. 2022; MANYI-LOH et al. 2018; WANG et al. 2020).

Segundo estudos recentes a estimativa de aumento do consumo de antibióticos por humanos foi de 65% entre 2010 e 2015 e previsão de 200% para 2030 e de 67% para o consumo animal entre 2010 e 2030 (KLEIN et al., 2018; POLIANCIUC et al., 2020; VAN BOECKEL et al., 2015a). Considerando sua liberação praticamente intacta no ambiente, entre 40 e 90 % não metabolizados e a remoção ineficiente pelas estações de tratamento de efluente (ETEs) e água (ETAs) (POLIANCIUC et al., 2020) uma grande quantidade deste xenobiótico chega ao meio ambiente. O que representa um enorme fluxo deste poluente no ecossistema aquático.

Nessa perspectiva, frente a enorme carga de antibiótico lançado no ambiente aquático, é importante avaliar o impacto no *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (TRIVINHO-STRIXINO, 2011) importante espécie neotropical que faz parte da cadeia alimentar exercendo fundamental papel ecológico e bioindicador da qualidade do ecossistema aquático (BROVINI; RANGEL; LIMA, 2022).

Neste estudo foi utilizado a ciprofloxacina (CIP) um antibiótico sintético da classe das fluorquinolonas de elevada potência e amplo espectro, eficaz contra diversas bactérias resistentes a outras drogas (SOUZA, M, V, N. et al., 2004). O *C. sancticaroli* foi exposto a concentrações ambientalmente relevantes de ciprofloxacina e utilizados os biomarcadores bioquímicos e moleculares para analisar os efeitos do antibiótico.

Para tal, foram traçados os seguintes objetivos específicos: analisar o efeito da ciprofloxacina na expressão gênica da hemoglobina B e determinar a atividade enzimática das seguintes enzimas: acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e esterase beta (EST- $\beta$ ) e da catalase (CAT). E assim poder avaliar o impacto do antibiótico no *C. sancticaroli*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos bioquímicos e moleculares de concentrações subletais da ciprofloxacina em *Chironomus sancticaroli* (Díptera: Chironomidae).

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Analisar o efeito da ciprofloxacina na expressão gênica da hemoglobina B nas concentrações 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .
- Determinar a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e esterase beta (EST- $\beta$ ) e da catalase (CAT).

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Chironomidae* - *Chironomus sancticaroli*

Chironomidae é uma família de insetos da ordem Diptera encontrados em todas as regiões geográficas do mundo (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). São organismos de vida livre, holometábolos com aproximadamente 20.000 espécies dispersas pelo mundo (ARMITAGE et al., 1995; PRAT et al., 2014). Compreendem espécies terrestres e aquáticas, porém, estas últimas são as principais representantes da fauna de Chironomidae e importantes organismos bentônicos que habitam diversos ecótopos se destacando em quantidade entre os macroinvertebrados do ecossistema aquático (SIQUEIRA; TRIVINHO-STRIXINO, 2005; OSPINA-PEREZ et al., 2019).

A família possui 541 gêneros e 11 subfamílias apresentando na região Neotropical a maior diversidade de espécies por subfamília do mundo (PAPE, BLAGODEROV, & MOSTOVSK, 2011; ANDERSEN et al. 2000). No Brasil ocorrem as subfamílias Tanypodinae, Orthoclaadiinae, Telmatogetoninae, Podonominae e Chironominae (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Os quironomídeos são mosquitos não picadores, com peças bucais não desenvolvidas para alimentação. Sua fase adulta e de pupa tem curta duração, os machos apresentam antenas plumosas com pedicelos globosos, as fêmeas antenas sem plumas com pedicelos menores e as larvas não têm espiráculos funcionais, são apnêusticas (CORREIA, 2004; CRANSTON, 2004).

Seus imaturos vivem em tubos, na superfície do sedimento, construídos com detritos e seda das glândulas salivares. Podem ser predadores, filtradores, raspadores, detritívoros, herbívoros, ectoparasitas ou apresentar mais de um tipo alimentar (PINDER, 1986; WALSHE, 1951; CRANSTON, 2004). Entre elementos de sua dieta estão diatomáceas, algas, detritos, oligoquetas, bactérias, brânquias de mexilhões, entre outros (PINDER, 1986; WALSHE, 1951; CRANSTON, 2004). Podem apresentar o comensalismo de organismos bentônicos maiores e com certa mobilidade como uma estratégia de proteção dos predadores e mudança de lugar (TOKESHI, 1993).

Suas larvas são ainda conhecidas como minhocas devido à presença de hemoglobina (Hb) na hemolinfa, característica que lhes permite extrair oxigênio de ambientes que apresentam baixa concentração de oxigênio (CRANSTON, 2004). Sua



hemoglobina tem alta afinidade pelo oxigênio e pode disponibilizá-lo para o uso mais rápido que a difusão (ARMITAGE et al., 1995). Além disso, é possível que a hemoglobina esteja envolvida no metabolismo de poluentes (HA; CHOI, 2008). As Hb são produzidas no corpo gorduroso e depois encaminhadas para a hemolinfa sendo que espécies do gênero *Chironomus* sintetizam globinas específicas para cada tecido e estágio larval (Mi-Hee Há et al., 2008).

*Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 tem grande importância ecológica para a região tropical, sendo encontrado principalmente no Brasil e na Argentina (BROVINI et al., 2022). Já foi considerada sinônimo de *Chironomus xanthus* Rempel, 1939, no entanto, a impossibilidade de uma comparação detalhada das espécies invalidou a sinonímia e manteve o nome da espécie como *Chironomus sancticaroli* (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

O ciclo de vida do *C. sancticaroli* descrito em laboratório é composto de ovo, larva, pupa e adultos, as fêmeas depositam entre 500 e 1045 ovos envoltos em uma substância mucilaginosa que na água formam um tubo curvo. Esses ovos levam 44 horas para eclodir e liberar as larvas de I instar, que permanecem na massa gelatinosa ainda por 12 horas até saírem nadando livremente e se instalarem no fundo da bandeja, para então, após, dois dias, construírem seus tubos (STRIXINO; STRIXINO, 1982).

A ovoposição é realizada na parte da manhã ou no final da tarde quando as fêmeas param próxima a superfície da água e com movimentos laterais do corpo vão liberando os ovos; ao término fazem um pequeno voo e prendem a massa ovígera na lateral da parede do recipiente mantendo-a submersa. É uma espécie de ciclo curto multivoltina, então a formação de novas gerações é contínua (STRIXINO; STRIXINO, 1985; TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1989).

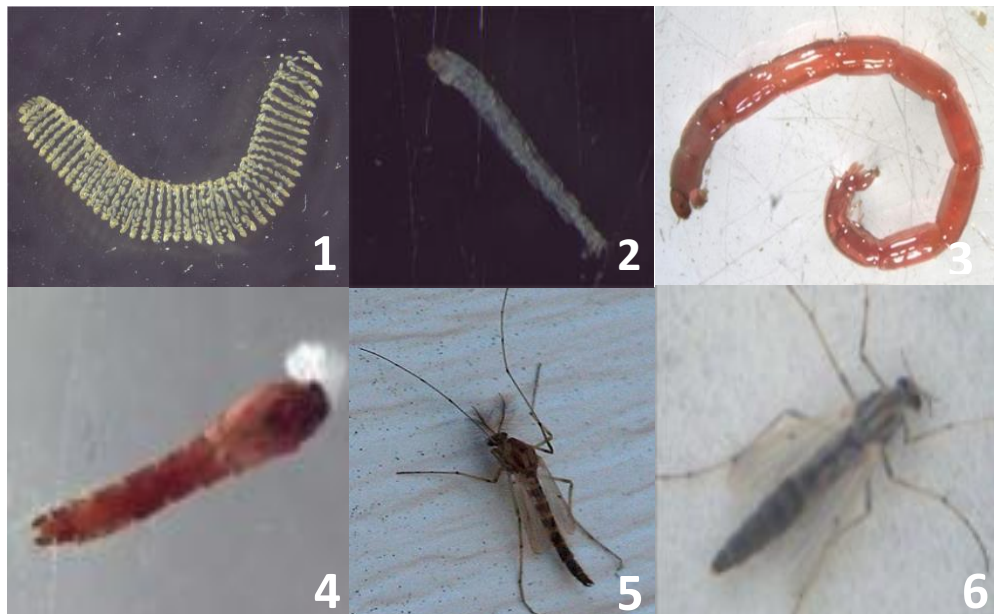
O estágio larval é composto por quatro instares que tem duração respectivamente 3, 2, 4 e 14 dias para o I, II, III e IV instar (RICHARDI et al., 2013). Sendo que a temperatura mais propícia para seu desenvolvimento é entre 18°C e 31°C e a ideal para maior sobrevivência é entre 22°C e 26°C, existe uma relação entre temperatura e desenvolvimento. Temperatura elevada acelera o desenvolvimento e diminui o tempo de crescimento dos indivíduos (STRIXINO; STRIXINO, 1985). As larvas de I instar são planctônicas e incolores e conforme vai aumentando a produção de hemoglobina, pigmento respiratório, a cor vai intensificando nos instares II e III até

que no IV ficam vermelhas, nestes últimos estágios as larvas são consideradas bentônicas (OH et al., 2014; STRIXINO; STRIXINO, 1982).

A próxima fase do desenvolvimento, o estágio de pupa, tem duração de apenas dois dias e é considerada uma fase vulnerável do ciclo, em consequência de sua exposição a predação e a diferentes condições ambientais para emergir o adulto (OLIVER, 1971; STRIXINO; STRIXINO, 1985). As pupas possuem um órgão respiratório e após seu completo desenvolvimento nada até a superfície para emergir o adulto (CRANSTON, 1995; PINDER, 1986).

O estágio terrestre do ciclo de vida dos quironomídeos é representado pelo adulto, fêmea e macho, que vivem por volta de quatro dias e não se alimentam, toda energia para reprodução vem do estágio larval (STRIXINO; STRIXINO, 1985; TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1989).

Figura 1: Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* – (1) Massa ovígera (2) Larva de primeiro ínstar (3) Larva de quarto ínstar (4) Pupa (5) Macho adulto (6) Fêmea adulto.



Fonte: O autor (2022).

Os Chironomidae são importantes organismos modelo para a ecotoxicologia nos estudos para avaliar a toxicidade dos poluentes ambientais (HERRERO et al., 2014). São amplamente utilizados como bioindicadores da qualidade dos sedimentos e da água (RICHARDI et al., 2015; REBECHI, et al., 2014) devido sua importância nos ecossistemas aquáticos e características próprias.

São organismos bentônicos de baixa mobilidade e importantes intermediários entre produtores e consumidores secundários sendo utilizados como alimento por várias espécies de peixes além de exercerem papel fundamental na ciclagem dos nutrientes (NICACIO, 2015; POLIANCIUC et al., 2020).

Apresentam ciclo de vida curto o que reflete mais rapidamente às modificações do ambiente e vivem próximo ao sedimento onde os poluentes se acumulam. São abundantes e amplamente distribuídos nos ecossistemas aquáticos sendo possível apontar maior variabilidade de respostas. Além disso, são capazes de suportar variados níveis de temperatura, concentração de oxigênio, pH, profundidade, produtividade e salinidade (GOULART, 2003; POLIANCIUC et al., 2020; REBECHI, 2014; RICHARDI et al., 2015).

### 3.2 BIOMARCADORES

Os efeitos potencialmente danosos dos contaminantes nos organismos e no ecossistema aquático podem ser mensurados pelos biomarcadores bioquímicos e moleculares, que são capazes de indicar sinais precoces de diversos poluentes neste ecossistema (DOMINGUES et al., 2007; PARK et al., 2009a; PRADO et al., 2023a).

Segundo Peakall (1994) biomarcadores são respostas biológicas à exposição de substâncias químicas que podem se manifestar desde nível molecular até a estrutura dos ecossistemas. São indicadores sensíveis de xenobióticos nos componentes vivos do ecossistema (PIÑA et al., 2007).

São utilizados em diversos estudos de ecotoxicidade devido sua capacidade de apresentar respostas da exposição dos organismos a contaminantes, mostrando os efeitos subletais, detectando diferentes poluentes e seus metabólitos, apontando as diversas situações de estresse na fase inicial e prever mudanças na qualidade do ambiente aquático (HE et al., 2011; VASCO et al., 2016; SARKAR et al., 2006).

São classificados em biomarcadores de exposição quando são usados para verificar e avaliar a exposição de um organismo a um poluente, biomarcadores de efeito quando apontam as alterações biológicas no organismo exposto ao contaminante e biomarcadores de suscetibilidade que vai evidenciar os diferentes níveis de respostas à exposição (COELHO; AMORIM, 2003).

Diferentes níveis de biomarcadores têm sido utilizados para avaliar os efeitos dos contaminantes ambientais, normalmente fundamentados em parâmetros

bioquímicos, moleculares, ontogenéticas, fisiológicos, citológicos, histológicos e populacionais. (LEE; CHOI, 2007; LEE et al., 2006; MORAIS et al., 2019; PIÑA et al., 2007; REBECHI-BAGGIO et al., 2016; RICHARDI et al., 2018). No nível bioquímico podem ser utilizados enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), do impulso nervoso como a acetilcolinesterase (AChE) e de biotransformação ou metabolismo das fases I e II como as esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e beta (EST- $\beta$ ) e a glutathione S-transferase (GST). No nível molecular tem se analisado o dano ao DNA e a expressão gênica de proteínas e enzimas, como as hemoglobinas (Hb) (LEE; CHOI, 2007; LEE et al., 2006; MORAIS et al., 2019; PIÑA et al., 2007; REBECHI-BAGGIO et al., 2016).

Entre os biomarcadores de parâmetro molecular a expressão gênica se embasa na análise da transcrição de genes, quantifica o RNA mensageiro (mRNA) que codifica proteínas ou enzimas. Normalmente a quantidade de proteína reflete a concentração de mRNA, mostrando uma relação entre os biomarcadores bioquímicos e de expressão gênica (PIÑA et al., 2007).

A análise da expressão gênica é realizada utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) descoberta na década de 1980, que mais tarde evoluiu para PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR ou quantitative Real-Time PCR). Esta técnica se tornou mais eficiente por fazer possível a amplificação e detecção ao mesmo tempo da sequência de DNA (KUBISTA et al., 2006).

A hemoglobina é um potencial parâmetro molecular em estudos de toxicidade ambiental em Chironomidae, devido às características únicas desta proteína neste inseto e sua importância como bioindicador ambiental (HA; CHOI, 2008a; LEE et al., 2006).

Esse pigmento respiratório é constituído de proteína inerte, de ligação reversível ao oxigênio ( $O^2$ ), que transporta e estoca  $O^2$  e dióxido de carbono. Está presente em quase todos os seres vivos do reino animal, porém, no grande grupo dos insetos possui apenas alguns representantes. O aparecimento da hemoglobina nos invertebrados pode estar relacionado à pressão de seleção a ambientes com baixos níveis de oxigênio (OSMULSKI; LEYKO, 1986).

No gênero *Chironomus* a hemoglobina, além das mesmas funções dos vertebrados, também realiza o tamponamento da hemolinfa ao se ligarem a resíduos do metabolismo (SHOBANOV, 2004). Além disso, apresentam características particulares como grande afinidade por oxigênio, alto grau de polimorfismo, localização extracelular, (OSMULSKI; LEYKO, 1986) e são, sobretudo, produzidas

pelo corpo gorduroso e enviadas para hemolinfa por peptídeos (BERGTROM et al., 1976).

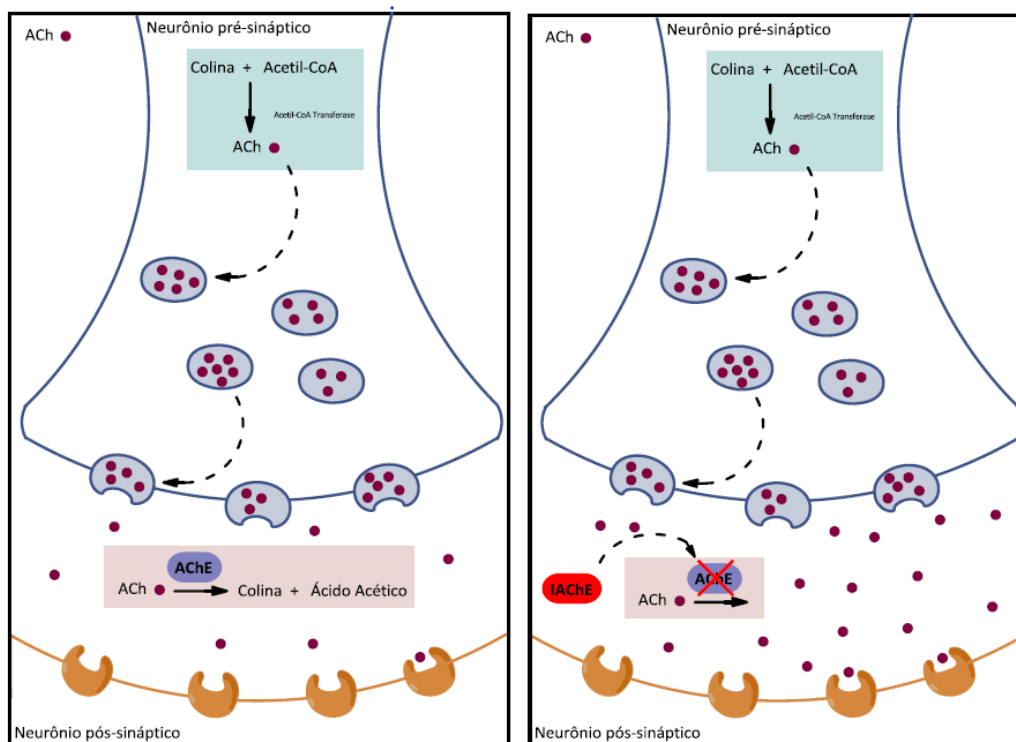
Estudos sobre os efeitos de poluentes ambientais na expressão gênica de proteínas e enzimas tem sido realizado como, por exemplo, Park et al. (2009b) que verificaram um aumento da expressão da hemoglobina A (HbA) mas nenhuma alteração da hemoglobina B (HbB) em *Chironomus riparius* exposto ao helmíntico fenbendazol. Lee et al., (2006) avaliaram a hemoglobina e proteína de choque térmico (HSPs) em *Chironomus tentans*, Han et al. (2016) analisaram a expressão da enzima GST, Nair et al. (2011) verificaram o aumento da expressão da catalase (CAT) e da glutathione S-transferase (GST) e Fernandez et al. (2022) avaliaram a glutathione redutase (GR) e a peroxidação lipídica (LPO).

### 3.2.1 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é um biomarcador do sistema nervoso que pertence à família de enzimas chamada esterases. É uma enzima que hidrolisa ésteres sendo classificada como uma esterase B, devido a sua capacidade de hidrolisar o p-nitrofenil butirato em uma taxa maior ou igual ao acetato de p-nitrofenil e ser inibida pela dietil p-nitrofenil fosfato (PEAKALL, 1992). É um importante bioindicador de neurotoxicidade.

Esta enzima vai catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas transformando-a em colina e ácido acético cessando a transmissão do impulso nervoso permitindo que neurônio colinérgico volte ao repouso. Os fármacos que bloqueiam a ação da AChE, chamados anticolinesterásicos, fazem com que a acetilcolina permaneça por longo período na fenda sináptica e nas junções neuromusculares causando uma hiperestimulação do neurônio o que leva a uma superestimulação do cérebro e dos tecidos musculares podendo ocorrer danos muscular e neural (ARAÚJO et al., 2016).

Figura 2: Representação da sinapse colinérgica na presença da acetilcolinesterase e na ausência.



Fonte: (Araújo et al. 2016)

Estudos de toxicidade de antibióticos demonstraram inibição da AChE em peixes (RODRIGUES et al., 2018; ZHAO et al., 2021) assim como em estudos com a mistura de antibióticos e outros poluentes (CUZZIOL BOCCIONI et al., 2021; FONTE et al., 2016). Em Rakotondravelo et al. (2006) também verificaram uma redução da atividade da AChE, porém em *Chironomus tentans* exposto a clorpirifós a  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Pelo contrário, Gomes et al. (2021) verificaram aumento da AChE em embrião de peixes expostos ao antibiótico triclosan. Em Dionísio et al. (2020) relataram um aumento da atividade da colinesterase no microcrustáceo, *Daphnia magna*, especificamente em exposição aguda ao antibiótico ciprofloxacina e inibição na exposição crônica. Da mesma forma, em Vicentini et al. (2017) a AChE apresentou alteração em larvas de *Chironomus sancticaroli* exposto ao hidrocarboneto aromático policíclico benzo(a)pireno.

### 3.2.2 Esterase alfa (EST- $\alpha$ ), Esterase beta (EST- $\beta$ )

A esterase alfa e esterase beta são enzimas de biotransformação da fase I do metabolismo ligadas à desintoxicação ou a bioativação de xenobióticos (CACCIATORE et al., 2013). São enzimas multifuncionais, hidrolíticas e extremamente variadas formando uma grande família que hidrolisam ésteres (ALVES BAFFI et al., 2007; DAHAN-MOSS; KOEKEMOER, 2016).

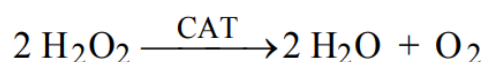
A exposição de um organismo a poluentes vai desencadear a biotransformação ou o metabolismo que é constituído pela fase I onde acontece a oxidação, redução e hidrólise de xenobióticos, a fase II onde ocorre a conjugação, que consiste na adição de grupos polares maiores aos poluentes ou drogas para facilitar a excreção, e a fase III onde ocorre o catabolismo de metabólitos (VAN DER OOST et al., 2003).

Em insetos também atuam no catabolismo e regulação do hormônio juvenil, desenvolvimento ontogenético, funcionamento do sistema nervoso, reprodução, digestão, comportamento e resistência a inseticidas e pesticidas (CHERTEMPS et al., 2012; PALAKSHA; SHAKUNTHALA, 2015).

Estudos relacionados às esterases como em Albuquerque et al, (2021) avaliaram a atividade da esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e esterase beta (EST- $\beta$ ) no díptero, *Chironomus sancticaroli*, sob a ação do herbicida atrazina, no ensaio agudo teve um aumento da EST- $\alpha$  enquanto que na crônica teve uma diminuição e a EST- $\beta$  apresentou alteração da atividade somente no ensaio agudo onde teve um aumento de 34%. Em Vicentini et al. (2017) as alfa e beta esterases também apresentaram aumento de atividade no *Chironomus sancticaroli* exposto ao hidrocarboneto aromático policíclico benzo(a)pireno.

### 3.2.3 Catalase (CAT)

A Catalase (CAT) é uma enzima do sistema de defesa antioxidante do corpo, que remove o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por dismutação em oxigênio molecular e água, protegendo as células do estresse oxidativo. Conforme a reação (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).



O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que se forma na atividade normal da célula, subproduto do metabolismo aeróbico, ou quando expostas a algum xenobiótico. Quando a produção de EROs excede as substâncias antioxidantes nas células, resulta em estresse oxidativo celular que pode levar a mutação e câncer, além de citotoxicidade (MATÉS, 2000).

As catalases são classificadas em: catalases típicas que apresentam o grupo prostético heme, homotetraméricas, monofuncionais, de estrutura conservada e estão presentes em todos os domínios da vida; as catalase-peroxidases da superfamília heme peroxidase, bifuncionais, encontradas em eubactérias, archaea e em dois ramos de eucariotos e as catalases de manganês não heme com centros de reação di-manganês são as mais antigas enzimas observadas apenas nas archaeas e bactérias (ZÁMOCKÝ et al., 2012; ZÁMOCKÝ; KOLLER, 1999).

Estão localizadas em todos os órgãos do corpo, mas principalmente nos peroxissomos, são um catalisador de alta atividade na redução do peróxido de hidrogênio em água (GALASSO et al., 2021; SUN, 1990). Por meio de reações ligadas a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a catalase participa da desintoxicação de substratos como álcoois e fenóis (REGOLI; GIULIANI, 2014).

O peróxido de hidrogênio também gera outras EROs pela reação de fenton e os EROs são altamente reativos, reagindo com diversas macromoléculas causando danos à célula, por isso, a catalase possui um importante papel na proteção celular (GALASSO et al., 2021).

Estudos relacionados a CAT como Park et al. (2018) analisaram as consequências do antibiótico sulfatiazol no díptero, *Chironomus riparius*, observando alteração na atividade enzimática da catalase o que resultou em estresse oxidativo e prejudicou o crescimento e o sistema endócrino do díptero. Além disso, a atividade da CAT também foi modificada em *Chironomus riparius* exposto ao inseticida fenitrothion (CHOI; ROCHE; CAQUET, 2009). Como também Moraes et al. (2019) encontraram uma elevação atividade da CAT em *Chironomus sancticarloi* na exposição subcrônica do metaloide antimônio. Zhang et al. (2015) descobriram uma regulação positiva da CAT em peixe exposto a tetraciclina e em Peltzer et al. (2017), citado anteriormente,



a atividade da catalase foi reduzida na larva do sapo, *Rhinella arenarum*, expostas a enrofloxacin.

### 3.3 AMBIENTE AQUÁTICO E A CIPROFLOXACINA

O planeta Terra possui sua superfície composta por 70% de água, a mesma, primordial à vida, apesar de ser um recurso renovável a sua disponibilidade é limitada o que a torna extremamente preciosa. Analisando o tamanho da população mundial, o seu consumo de água e a quantidade existente de água doce, estima-se que esta poderia suprir a humanidade por 18,71 anos caso não haja outras fontes alternativas ou renovação eficaz. Apesar disto, há constante contaminação hídrica causada pela sua utilização inadequada, aumento da população e gestão ineficaz, a terra sofrerá extremas crises hídricas até 2050 (BARROS; AMIN, 2007; HUSSAIN; NAEEM; CHAUDHRY, 2016).

Os ecossistemas aquáticos mantêm uma grande parte da diversidade biológica de nosso planeta. Existe uma grande relação entre este recurso valioso e a sua biodiversidade já que desempenham diversas funções e são indispensáveis para as comunidades bióticas. Os oceanos, mares e corpos d'água doce possuem uma enorme diversidade de espécies, os quais demonstram extrema fragilidade à alterações em seus ambientes (IRFAN; ALATAWI, 2019).

Como definição a poluição é a transformação que possui capacidade de deteriorar a interdependência entre os seres vivos e o ambiente, inserindo ou extraíndo de forma direta ou indireta, compostos oriundos de ações humanas que possuem impactos prejudiciais à biota e aos seres humanos (CHAPMAN, 1996).

O ambiente aquático é atingido por enormes quantidades de poluentes, elementos tóxicos provindos de diversas origens. Indústrias despejam seus produtos prejudiciais, despejos de esgotos humanos, acidentes com substâncias químicas, contaminantes agrícolas, matérias orgânicas, metais pesados, enfim diversos compostos xenobióticos (ARIAS et al., 2007).

Apesar do ecossistema aquático ter diversos meios de absorver os elementos tóxicos, quando estes superam níveis superiores ao ambiente receptor, afligem a vida das comunidades bióticas que ali vivem. Essas mudanças causadas aos recursos hídricos, pela contaminação, modificam a sua qualidade, alteram ou retiram a luz, o oxigênio, chegam a conectar-se aos sedimentos, de forma física e química, e

perseveraram durante um extenso intervalo de tempo até serem absorvidas pelos organismos deste meio, os afetando de formas desfavorável. Assim os sedimentos podem agir como decompositores dos poluentes ou agir como disseminadores (AMARANTE JUNIOR et al., 2003; CASTRO-CATALÀ et al., 2016).

Dentre os compostos xenobióticos que demonstram persistência no ambiente aquático há uma classe de compostos considerados emergentes, os fármacos. Produzidos em grande escala, os compostos farmacêuticos atraem grande atenção devido sua capacidade de permanência no meio ambiente e por não serem totalmente removidos pelas estações de tratamento de água (AMÉRICO et al., 2012; BILA, D. M.; DEZOTTI, 2003).

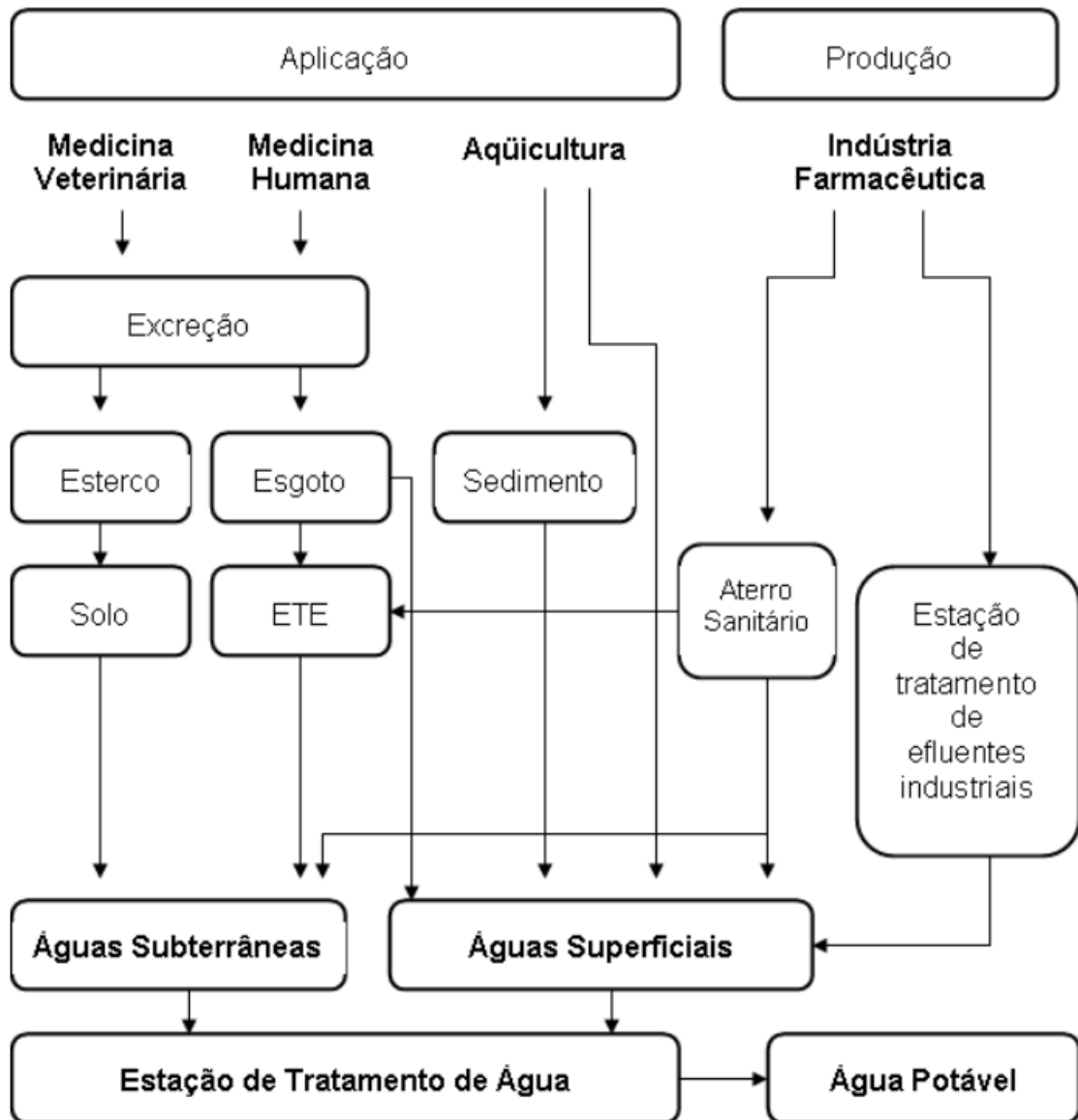
As legislações vigentes que fazem o controle da qualidade da água não apresentam regulamentação específica para os contaminantes emergentes (ZENKER et al., 2014).

Os fármacos são fabricados com o intuito de agir no corpo como tratamento podendo atravessar membranas biológicas e permanecer no corpo. As suas moléculas possuem uma composição biologicamente ativa, podendo ter diversas características como: serem hidrossolúveis, não voláteis, polares e não absorvíveis ou lipossolúveis, os quais, demonstram predisposição a se acumularem em organismos de níveis tróficos mais baixos (BOTTONI; CAROLI; CARACCIOLO, 2010).

Foi nos Estados Unidos que houve o primeiro registro de fármacos em esgotos, sendo o ácido clorídrico em concentrações de 0,8 a 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , outros países como Alemanha, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália e Suécia também os identificaram em seus recursos hídricos incluindo desde águas residuais até águas subterrâneas (AMÉRICO et al., 2012; BILA, D. M.; DEZOTTI, 2003).

São diversos os caminhos possíveis para que os produtos farmacêuticos atinjam o ecossistema aquático. Algumas fontes são o homem através de seus efluentes domésticos, os hospitais os quais despejam componentes em grandes concentrações, a pecuária, agricultura, fabricação farmacêutica, aquicultura, entre outros (BEEK et al., 2016).

Figura 3: Esquema das vias de origem da contaminação do ecossistema aquático.



Fonte: (Bila, D. M. e Dezotti, 2003)

As indústrias farmacêuticas despejam enormes quantidades de seus produtos em efluentes que chegam às estações de tratamento de água. A situação é mais crítica nos países subdesenvolvidos, na Índia foi registrado no esgoto uma grande concentração de ciprofloxacina  $31 \text{ mg L}^{-1}$ , no Paquistão foi encontrado também a ciprofloxacina de  $3,0$  à  $5,25 \text{ mg L}^{-1}$ , oxitetraciclina de até  $9,40 \text{ mg L}^{-1}$ , levofloxacina chegando a  $6,20 \text{ mg L}^{-1}$  entre outros. Os hospitais, as residências e a criação animal também descarregam pela urina e fezes grande quantidade de fármacos que foram consumidos e não foram assimilados completamente pelo organismo. Alguns hospitais chegam a efetuar o tratamento das suas águas residuais

com o intuito de diminuir o grau da contaminação, porém essa eliminação é restrita (0-40%) (HUSSAIN; NAEEM; CHAUDHRY, 2016; LARSSON; DE PEDRO; PAXEUS, 2007; ZHOU et al., 2023; JANECKO et al., 2016).

Em rios poloneses a CIP chegou a  $2,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (WAGIL et al., 2014). Em efluentes de estação de tratamento de esgoto na República Checa foi de  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina (GOLOVKO et al., 2014). Em águas superficiais do Vietnã registrou ocorrência de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ , na China  $5,9 \mu\text{g L}^{-1}$  e Argentina  $7,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (ROSAS-RAMÍREZ et al., 2022).

Aterros sanitários também são uma via de contaminação no que se refere aos resíduos sólidos, uma mistura de fármacos é descartada nos lixos domésticos, lixos dos hospitais e até das indústrias sendo o seu destino os aterros, que quando não são selados devidamente se tornam lixiviados e escoam até o solo e recursos hídricos. Somente 15% dos produtos farmacêuticos podem ser eliminados caso haja instalações de tratamentos nos aterros (LU et al., 2016; SCHWARZBAUER et al., 2002).

Existem diversos estudos de tecnologias para eliminar os contaminantes emergentes devido ao risco de persistência no ambiente e consequentemente a bioacumulação. A nanotecnologia demonstrou grande sucesso na remoção dos poluentes nos experimentos em laboratório, porém ainda se faz necessário melhorar a técnica para efetivar a aplicação no ambiente (KARTHIGADEVI et al., 2021)

Existem diversos tipos de fármacos, antibióticos, antidepressivos, hormônios, anti-inflamatórios, analgésicos, entre outros, que são classificados de acordo com suas características de estrutura, propriedade e função. O antibiótico é um medicamento quimioterápico que possui como função a inibição de bactérias, fungos e vírus sendo divididos conforme sua estrutura química ou seu mecanismo de ação em quinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos,  $\beta$ -lactâmicos e  $\gamma$ -lactams. Este produto farmacêutico é considerado um contaminante emergente devido a sua característica físico-química, biológica, sua vasta utilização tanto pelo homem, por conta do aumento da população, quanto pela agropecuária, cuja demanda pela proteína animal se intensificou, assim como, pela falta de regulamentação da concentração no meio ambiente. (KÜMMERER, 2009; LENG et al., 2020; OKOYE et al., 2022; VAN BOECKEL et al., 2015b; ZHAO et al., 2019; MONTAGNER et al. 2017)

No ambiente aquático os antibióticos são encontrados em concentrações de  $\text{ng L}^{-1}$ - $\mu\text{g L}^{-1}$ , e apesar da pequena quantidade, podem causar danos crônicos nos

organismos aquáticos, pois alguns são expostos por todo seu ciclo de vida. Os danos se apresentam na reprodução, crescimento e comportamento dos organismos. Além disso, prejudicam intensamente os produtores primários e decompositores, causam o desaparecimento de populações microbianas, modificam a degradação da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a redução de sulfato, a transformação de nitrogênio e a metanogênese, eliminando o papel ecológico de organismos, desestabilizando o ecossistema aquático e o ciclo biogeoquímico (KOVALAKOVA et al., 2020).

Promovem ainda a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs), resistência antimicrobiana (AMR), cepas microbianas capazes de sobreviver aos antibióticos, e genes de resistência a antibióticos (GRAs). Estes patógenos resistentes, bactérias multirresistentes e panresistentes ou superbactérias vão dificultar o tratamento de infecções humanas e animais (CHATURVEDIAB et al., 2021; MACHOWSKA; LUNDBORG, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Segundo LIM et al. (2020a) a resistência bacteriana pode causar mais de 10 milhões de mortes por ano até 2050.

Além disso, favorecem o aparecimento de resistência em bactérias do sedimento marinho e bactérias nitrificantes. Causam também toxicidade em cianobactérias, algas, microcrustáceos e peixes, afetando assim organismos de diferentes níveis tróficos prejudicando o ecossistema aquático e os seres humanos (CARVALHO; JUNIOR; AMÉRICO-PINHEIRO, 2016).

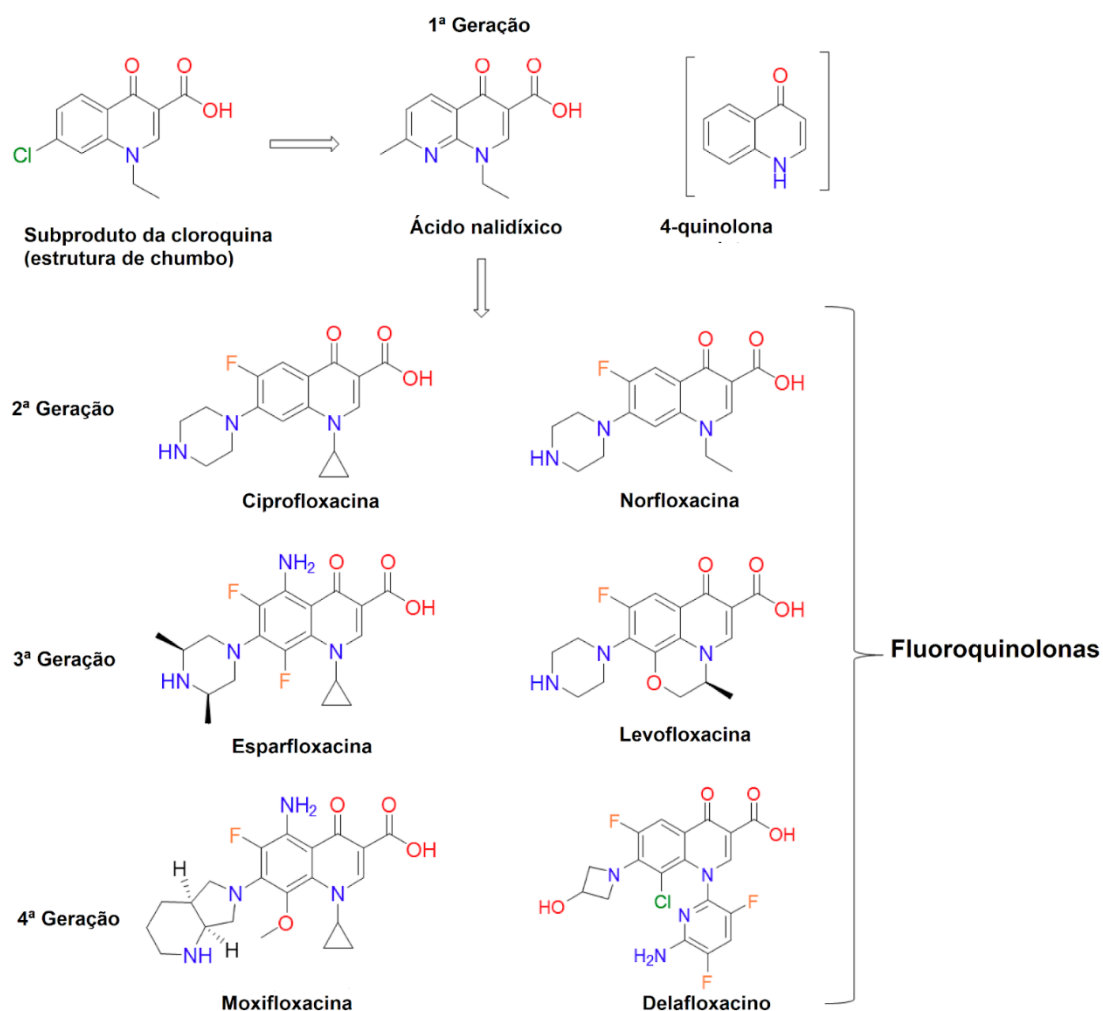
Os antibióticos são classificados em sintéticos ou naturais e entre os sintéticos estão as quinolonas, uma família originada da cloroquina, um fármaco antimalárico, que possui quatro gerações. Considerado da primeira geração o ácido nalidíxico foi descoberto em 1962, visto como um resíduo da cloroquina, sua relevância em relação a seus semelhantes foi por conta de sua ação contra bactérias Gram-negativas, assim iniciou o mercado de antibióticos sintéticos quando aprovado para tratamento de infecções urinárias (BAPTISTUCCI, 2012; ANJALI et al. 2019).

Seguido pelo intuito de melhoria contínua das quinolonas, foi substituído um átomo de carbono (C-6) pelo flúor criando uma fluoroquinolona (FQ). A Flumequina foi o primeiro composto desta transformação que devido sua toxicidade alta foi descartado para uso, por conseguinte foi adicionado na posição C-7 um anel de piperazina e um grupo de ciclopropila o que levou às quinolonas para a segunda geração. Com esta transformação as fluoroquinolonas apresentam biodisponibilidade

superior, aumento de seu espectro de atividade, menor toxicidade, maior resistividade e suas propriedades de efeito e ação foram melhoradas (BUSH et al., 2020).

Apesar da segunda geração ter sido iniciada pela Norfloxacinina foi a Ciprofloxacina que ganhou grande destaque, o composto mais ativo da geração devido a sua ação sistêmica eficiente. O progresso das gerações subsequentes houve um foco nas vinculações estrutura-atividade com base no resultado da Ciprofloxacina gerando uma grande quantidade de FQ's, a terceira e quarta geração das quinolonas são mais potentes, eficazes, amplamente ativas e conseguem atuar contra bactérias Gram-positivas e organismos anaeróbicos (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019)

Figura 4: Gerações da Quinolona.

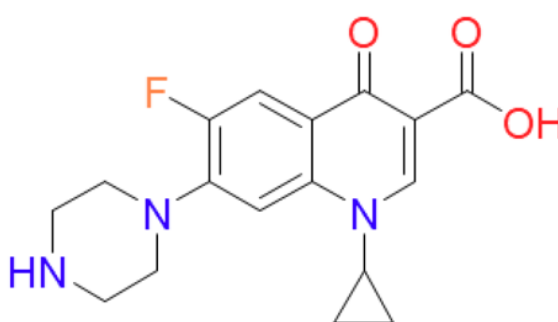


Fonte: (BUSH et al., 2020)

As fluoroquinolonas não são imediatamente biodegradáveis, assim os seus resquícios e metabólitos são identificados com muita facilidade no solo e na água, isso por conta de suas características de sorção. Como resultado há o aumento do seu tempo de degradação, há diversos meios usados para degradar esses fármacos: degradação química, onde é utilizado fungos como é o caso do *Gloeophyllum striatum*, o fungo da podridão parda, degradação térmica, reações fotolíticas e de Fenton. Há também a irradiação ultrassônica que degrada a ciprofloxacina em solução aquosa de acordo com o pH da solução. Porém a degradação resulta em metabólitos mais tóxicos para o ambiente que a própria ciprofloxacina (DE BEL et al., 2009; WETZSTEIN; SCHMEER; KARL, 1997; ANJALI et al. 2019).

A ciprofloxacina (CIP) é uma potente droga de amplo espectro, produzida pela Bayer e aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para via oral em 1987 e para via intravenosa em 1991. Sua estrutura química é formada pelo ácido 3-quinolino-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil) carboxílico (SOUZA, M, V, N; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A, D; COURI, 2004). Agem nas topoisomerase II ou DNA girase das bactérias gram-negativas, uma enzima importante para a reparação, replicação e transcrição do DNA da bactéria e na topoisomerase IV nas bactérias gram-positivas. A DNA girase é formada por quatro subunidades, duas subunidades A e duas B, a CIP se liga à subunidade A (SOUZA, M, V, N; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A, D; COURI, 2004).

Figura 5: Estrutura da Ciprofloxacina.



**Ciprofloxacina**

Fonte: (BUSH et al., 2020)

Considerada um poderoso antibiótico é utilizada para o tratamento de infecções urinárias, das articulações, dos ossos, respiratória, gastrointestinais e de pele na medicina humana e veterinária (ANJALI et al. 2109) e seu descarte impacta o meio

aquoso agindo de forma tóxica aos organismos que ali habitam. Estudos demonstram que suas ações são graves e extremamente danosas para grande parte das espécies, invertebrados e vertebrados, sendo o nível trófico mais baixo o mais afetado. Possuem a capacidade, assim como outras FQ's, de agir de forma pró-oxidativa em diferentes organismos e devido a isso são conhecidas como genotóxicas putativas (MARTINS et al., 2012; NUNES et al., 2018)

São diversos os experimentos com a CIP em organismos aquáticos que buscam verificar sua toxicidade. Como no estudo com o crustáceo planctônico *Daphnia magna*, cujos testes efetuados por Martins et al. (2012) observaram danos crônicos em sua história de vida e a metade da concentração efetiva máxima (EC50), concentração do composto para qual 50% do efeito é observado, foi 65,3 mg L<sup>-1</sup> já Dionísio et al. (2020) encontrou 36,493 mg L<sup>-1</sup> e Dalla Bona et al. (2015) 36 (23-58) mg L<sup>-1</sup>. Também com a *Daphnia magna* Yisa et al. (2023) descobriu que a CIP apresenta uma ameaça capaz de modificar o desenvolvimento da comunidade de *Daphnia magna*, pois a CIP gerou uma elevação nos níveis de EROS indicado que a glutathione-S-transferases e peroxidases não foram suficientes para anular os efeitos da contaminação, gerando um estresse oxidativo.

Em estudo com *Danio rerio* (Halmilton 1822), peixe-zebra, a exposição de 25 mg L<sup>-1</sup> de CIP em adultos por 96 horas ocasionou excitação na locomoção, queda da cognição, alteração no comportamento de exploração, aprendizado e houve a exposição de comportamento agressivo (PETERSEN et al., 2021). Outra pesquisa com peixes encontrou malformação do saco vitelínico e craniofacial, genotoxicidade, alterações hematológicas, danos histopatológicos e estresse oxidativo (KITAMURA et al., 2022; ROSAS-RAMÍREZ et al., 2022).

Em organismos aquáticos fotoautotróficos a CIP se mostrou tóxica, apresentando EC50 de 10 µg L<sup>-1</sup> para cianobactéria *Anabaena flos-aquae*, de >8.042 µg L<sup>-1</sup> para microalga de água doce *Desmodesmus subspicatus*, para planta aquática *Lemna minor* o EC50 foi de 62,5 µg L<sup>-1</sup> e para a dicotiledônea *Myriophyllum spicatum* (Haloporaceae) a CP se mostrou de leve a média toxicidade (EBERT et al., 2011b). Na alga de água doce *Chlorella vulgaris* a CIP diminuiu seu crescimento na concentração de 12,5 mg/l, como também a clorofila teve uma redução, o EC50 foi de 20,6 mg/l, em baixas concentrações (<5,0 mg/L) o etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e a Glutathione reduzida (GSH) diminuíram enquanto que aumentaram em alta concentração (>12,5 mg/L) e CAT e GST apresentaram aumento em baixas



concentrações e reduziram em alta concentração (NIE et al., 2008). Em planta aquática *Lemna minor* foi verificado ainda alterações da fotossíntese, inibição do crescimento e estresse oxidativo (GOMES et al., 2017b)

No poliqueta *Hediste diversicolor* a CIP causou hiperatividade e aumento no tempo de escavação, aumento da atividade da catalase e da acetilcolinesterase e diminuição da peroxidação lipídica, constatando em baixa concentração da ciprofloxacina a formação de EROS (NOGUEIRA; NUNES, 2020).

Estudos sobre os efeitos da ciprofloxacina em Chironomidae são inexistentes. Alguns outros estudos verificaram efeitos de outros antibióticos em Chironomidae. Como a tetraciclina que causou danos moleculares e bioquímicos em *Chironomus riparius* (XIE et al., 2019a). Outro estudo em *C. riparius* exposto a sulfadiazina mostrou a bioacumulação, estresse e desregulação endócrina (XIE et al., 2019b). O sulfatiazol causou alterações na razão sexual, crescimento, deformidade do aparelho bucal e na sobrevivência de *C. riparius* (PARK; KWAK, 2018).

Martínez-Paz et al. (2017) apontaram que o triclosan é um disruptor endócrino atuando no hormônio ecdisteróides do *C. riparius*. Efeitos no sistema de biotransformação inibindo genes da GST e do citocromo P450 também foram observados no *C. riparius* exposto ao triclosan (MARTÍNEZ-PAZ, 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E CRIAÇÃO CHIRONOMIDAE

As massas ovígeras de *Chironomus sancticaroli* foram obtidas da colônia matriz, mantida desde 2008, sob protocolo de Maier et al. (1990), com modificações na temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo (12h claro:12h escuro) e protocolo de Vicentini et al. (2017) em que foi substituída a água areada por reconstituída. A colônia fica no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFC<sup>2</sup>), localizado no Departamento de Zoologia (Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná - UFPR).

Organismos desta colônia foram depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP), números vouchers 249269 a 249276.

Os Chironomidae foram criados em dois aquários de vidro com capacidade de 10 L e dimensões de 25 cm x 15 cm x 25 cm, com 2 cm de substrato de areia autoclavada e sete litros de água reconstituída em temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, 80% de umidade e aeração constante. Os aquários foram cercados por uma estrutura de madeira e tela com aberturas circulares envoltos em voil para oferecer espaço de emergência e conter os adultos (Figura 6).

Figura 6: Criação do *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: O autor (2022)

A alimentação das larvas foi realizada três vezes na semana com 2,5 g de ração para cachorro Dog Chow®, assim como a limpeza e mensalmente parte da água dos aquários foi trocada por nova água reconstituída. Nos aquários acontecia todo o ciclo de vida do *C. sancticaroli*: os adultos copulavam, as fêmeas colocam sua massa ovígeras presas por um pedúnculo na lateral do aquário, após a emergência as larvas se alimentavam da massa gelatinosa e desciam para a superfície do sedimento onde construíam seus túneis, posteriormente empupam e emergem os adultos.

A água reconstituída consistia da mistura de duas soluções. Na preparação de 1 L usava-se 8 mL da solução 1, que correspondia a sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a  $8,7 \mu\text{M}$ , mais 4 mL da solução 2, formada por cloreto de potássio (KCl) a  $2,7 \mu\text{M}$ ; bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a  $57 \mu\text{M}$  e sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a  $24,7 \mu\text{M}$ , somando-se a 988 mL de água destilada.

## 4.2 BIOENSAIO DE TOXICIDADE

O bioensaio de toxicidade foi realizado em grupos de larvas de I instar expostas a duas concentrações do antibiótico ciprofloxacina, ao mesmo tempo, outros grupos foram mantidos como controle. O ensaio de toxicidade subcrônico estático (a solução não foi trocada durante o teste) teve duração de 11 dias. Foi executado em aquários de vidro de dimensões de 10 cm x 20 cm x 10 cm, de três réplicas para cada concentração do antibiótico e para o controle.

Figura 7: Aquários de vidro do bioensaio.



Fonte: O autor (2022)

Para cada réplica foi preparado 199,8 g de substrato, 750 mL de água reconstituída, solução de ciprofloxacina (CIP), larvas de I instar e um preparado líquido de ração para peixes TetraMin®, resultando em 1 cm de sedimento e 4 cm de água em cada réplica dos aquários. A ração líquida foi preparada com 1 g de ração para

peixes TetraMin® em 20 mL de água. O substrato foi previamente preparado com 150 g areia de quartzo branco (Sigma-Aldrich®), 40 g de caulinita, 9,8 g de turfa (sem água) e 750 mL de água reconstituída e colocado na estufa incubadora (BODs) com temperatura de 23°C, fotoperíodo de 12 h e em aeração por sete dias.

Para o ensaio foram retiradas da colônia matriz, cinco massas ovígeras com cerca de 800 ovos e depositadas em placas petri com água reconstituída e mantidas nas mesmas condições da colônia: em temperatura de 25°C  $\pm$  2, fotoperíodo 12 h e umidade em torno de 80%. Após a eclosão das larvas de I instar e saída da mucilagem gelatinosa, foram transferidas para os aquários de vidro preparados com o sedimento, água reconstituída e a CIP. Para tanto foram utilizadas 50 larvas para cada réplica de cada concentração mais o controle, totalizando 450 larvas de I instar. Os organismos foram expostos as concentrações de 1,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de solução do antibiótico ciprofloxacina de grau analítico obtida da Sigma-Aldrich (Brasil). As concentrações necessárias para o experimento foram obtidas a partir da diluição com água ultrapura da solução de 10 mg mL<sup>-1</sup> de CIIP.

Em seguida os aquários foram acondicionados em estufas incubadoras (BODs) onde as larvas do *Chironomus sancticaroli* permaneceram por um período de 11 dias a uma temperatura entre 25°C ( $\pm$  1°C) fotoperíodo 12 h claro e escuro e em aeração constante (Figura 8). Alimentados uma vez por dia, em dias alternados, com 1 mL e 1,5 mL de ração líquida de TetraMin® para peixes. Após o período de exposição ao xenobiótico um total de 330 larvas de III e IV ínstares (das concentrações e do controle) foram armazenadas em freezer -80°C.

Figura 8: Bioensaio subcrônico: Aquários de vidro cobertos com plástico filme e bomba de aeração.



Fonte: O autor (2022)

#### 4.3 ENSAIO MOLECULAR

Para observar a expressão gênica da hemoglobina B, as larvas foram retiradas do freezer -80°C e procedido a extração de RNA pelo kit de extração da RNeasy Mini Kit (Qiagen®). Larvas de III e IV instares, de 11 dias de tratamento, foram utilizadas neste ensaio.

Foi realizada a extração de RNA de 13 *pools* de cinco larvas para cada concentração (1,3 µg L<sup>-1</sup> e 2,9 µg L<sup>-1</sup>) e controle. As larvas foram adicionadas no eppendorf de 1,5 mL com 350 µL do tampão RLT de lise celular fornecidos pelo kit de extração e homogeneizadas com o auxílio de um pistilo autoclavado. Imediatamente seguiu-se o protocolo do kit, alcançando 30 µL de RNA de cada amostra. Após o procedimento foi realizada eletroforese com gel de agarose a 1,5 % para verificar a qualidade do RNA, assim como, quantificação das amostras no espectrofotômetro NanoDrop®.

Logo após as amostras foram tratadas com DNase para remover DNA contaminante. Para tanto foi usado DNase da Invitrogen® que em conformidade com o protocolo as amostras foram tratadas com 3 µL de buffer, 3 µL de DNase e 24 µL de RNA + água de acordo com a quantidade de RNA de cada amostra o volume da água muda. Em seguida foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente adicionado 3 µL de Edta (solução de parada) e levado ao termociclador por 10 minutos a 70 °C. Subsequente nova eletroforese e medição da concentração, para verificar integridade e padronizar as amostras.

Para proceder à transcrição reversa do RNA para DNA complementar (cDNA) foi utilizado *High Capacity* cDNA Reverse Transcription Kit. Para cada amostra foram utilizados um Master Mix composto por: 2 µL buffer; 0,8 µL dNTP; 2 µL de primer (Invitrogen®) e 1 µL enzima RT totalizando um volume de 5,8 µL mais RNA + água mili-q em volumes variáveis de acordo com a quantidade de RNA em cada amostra, totalizando no final volume de 20 µL. Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador por 50 minutos a uma temperatura de 50°C e 5 minutos a 95°C, após armazenados em freezer -20°C.

Para realizar a PCR tempo real as 20 µL de amostras de cDNA foram diluídas em 80 µL de água mili-q totalizando 100 µL. A reação foi preparada com 1 µL de cDNA diluído mais o master mix que foi composto por 5 µL SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), 0,3 µL de *primer reverse* e 0,3 µL *primer forward* ambos a 10 µM

(Eurofins®) e 3,4 µL de água mili-q. Foram utilizados *primers* do gene de interesse e do gene da actina para normalização.

A leitura foi realizada no termociclador Rotor-Gene Q da Qiagen seguindo protocolo de 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 min, 40 ciclos a 95°C por 15s e por fim 60°C por 60s. Para cada amostra foram feitas três réplicas sendo o controle negativo composto por água mais o mix da reação. O *threshold* (*cycle threshold* - *Ct*) foi padronizado no ponto de limiar da reação (maior amplificação) e as curvas de *melting* foram avaliadas no final das corridas para controlar a qualidade da amplificação. A análise desses dados foi processada pelo software Rotor-Gene Q.

Para a análise da expressão do gene da hemoglobina B foi utilizado o método comparativo ou Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Com os resultados de *Ct* (*threshold cycle*) foi calculado o  $\Delta Ct$  de cada amostra pela subtração do *Ct* do gene de referência pelo *Ct* do gene de interesse, em seguida o Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) e por fim o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que determinou a expressão relativa do gene de interesse.

Para a análise estatística dos diferentes níveis da expressão gênica foi empregado o programa Past 3 e aplicado os testes Shapiro-Wilki para verificar a normalidade dos dados e confirmado pelo gráfico de resíduos e por último o teste ANOVA – *one way* e Tukey ambos com níveis de significância de  $p < 0,05$ .

#### 4.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A análise da atividade enzimática foi realizada nas amostras expostas a ciprofloxacina nas concentrações de 1,3 µg L<sup>-1</sup> e 2,9 µg L<sup>-1</sup>, em ensaio subcrônico de 11 dias, a homogeneização das amostras seguiu o protocolo de homogeneização de Valle & Montella (2006) e norma específica para cada enzima. Como no molecular foram utilizadas larvas de II e IV instares.

Na preparação da homogeneização, as amostras foram retiradas do freezer - 80°C e deixadas para descongelar sobre o gelo. Após o descongelamento as amostras de pool de cinco larvas foram colocadas em novos eppendorf de 1,5 mL e adicionado 30 µL água mili-q e homogeneizados com um homogeneizador automático. Em seguida foi adicionado 590 µL de água mili-q atingindo 620 µL no total. Retirando as amostras da acetilcolinesterase (AChE), foram centrifugados a 12000 xg por minuto a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo eppendorf e então pipetado o volume

adequado para cada enzima na placa mãe (microplaca de 96 poços) e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram analisados 8 *pools* de cinco larvas para cada concentração ( $1,3\ \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,9\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) e controle.

Para quantificar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi empregado o protocolo de Ellman et al. (1961), modificado por Silva De Assis, (1998) para microplaca de 96 poços. O método consiste em identificar o 2-nitrobenzoato 5-mercaptopicolina e o 5-tio-2- nitrobenzoato (ânion de coloração amarela que será quantificado pelo espectrofotômetro) produtos da reação entre a tiocolina (produto da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase) com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB).

Em uma microplaca foi preparado uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  da amostra mais 50  $\mu\text{L}$  de iodetoacetilticolina (ATC) a 10 mM, 200  $\mu\text{L}$  de 5,5 Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB) a 0,75 mM e incubado em luz e temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foi procedida a leitura por cinco minutos a cada 1 minuto a um comprimento de onda de 405nm.

O protocolo aplicado para analisar a atividade das Esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e Esterase beta (EST- $\beta$ ) foi de Valle & Montella (2006). Método que se baseia, nessa ordem, no consumo do substrato  $\alpha$ -naftil pela enzima EST- $\alpha$  transformando-o em  $\alpha$ -naftol, e no consumo do substrato  $\beta$ -naftil pela enzima EST- $\beta$  resultando em  $\beta$ -naftol. Em seguida é adicionado o corante Fast blue nas reações que são então bloqueadas e a quantidade do produto de ambas pode ser avaliado pela coloração produzida.

Ambas as reações foram preparadas com 10  $\mu\text{L}$  da amostra pipetadas em microplacas de 96 poços. Posteriormente para avaliar a Esterase alfa (EST- $\alpha$ ) foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de alfa-naftil acetato/Na fosfato na molaridade 0,3 mM e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida é adicionado 50  $\mu\text{L}$  de Fast blue a 0,3% e incubada por 5 minutos. Logo após, é realizada a leitura *end point* em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570 nm.

O mesmo procedimento foi seguido para mensurar a Esterase beta (EST- $\beta$ ), ao adicionar 200  $\mu\text{L}$  de beta-naftil acetato/Nafosfato (0,3 mM), 50  $\mu\text{L}$  de Fast blue e seguir preparação e leitura. Como controle positivo para reação da Esterase alfa foi utilizado alfa-naftol ( $0,3\ \text{mg L}^{-1}$ ) e para o ensaio da Esterase beta o beta-naftol ( $0,3\ \text{mg L}^{-1}$ ).

A atividade enzimática da catalase (CAT) foi avaliada pelo protocolo de (AEBI, 1984), cujo princípio se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) exógeno



pela atividade da catalase que libera oxigênio e água. O teste foi preparado com a adição de 5  $\mu\text{L}$  da amostra em microplacas de 96 poços, com fundo chato e transparente, da Greiner Bio-one® (específicas para leitura a 240nm) mais 295  $\mu\text{L}$  de solução de reação (peróxido de hidrogênio 30 %, tampão Tris-base a 1 M / EDTA 5 mM e pH 8,0 e água mili-q). A leitura realizada pelo espectrofotômetro foi de 5 minutos a cada 15 segundos a um comprimento de onda de 240nm.

A concentração de proteína total - PTN foi mensurada pela norma de Bradford, (1976). Este ensaio fornece a quantidade de proteína total de cada amostra e essa medida é um importante normalizador do resultado das enzimas. Para reação foi utilizado 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 250  $\mu\text{L}$  de corante Bradford diluído em água mili-q na proporção de 1:5. Para controle positivo foi usado 10  $\mu\text{L}$  de Albumina Sérica Bovina (BSA) e realizada leitura pelo espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm.

A análise estatística foi realizada no programa Past 3, onde foram analisados a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, confirmado pelo gráfico de resíduos, homogeneidade pelo Levene's, variância pelo teste ANOVA – *one way* e a posteriori para comparação par a par dos tratamentos o teste Tukey, ambos com níveis de significância de  $p < 0,05$ . Para os dados que não seguiram os pressupostos de normalidade e homogeneidade foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn's post hoc a posteriori.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A expressão gênica da hemoglobina B (HbB) nas larvas do *Chironomus sancticaroli* mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em ambos os tratamentos de CIP ( $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao controle. Nas duas concentrações houve uma diminuição significativa da expressão gênica da HbB em relação ao grupo controle. Os dados mostraram homogeneidade e o teste Shapiro-Wilki confirmou a normalidade apresentando  $p = 0,1144$  no tratamento de  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $p = 0,9199$  para o tratamento na concentração de  $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$ . Em seguida foi realizado o teste de variância ANOVA – *one way* com  $p = 2,515\text{E-}05$ , seguido pelo teste de Tukey.



Figura 9: Expressão gênica da hemoglobina B (HbB) de larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica (11 dias). (CT) Controle, concentrações 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina.

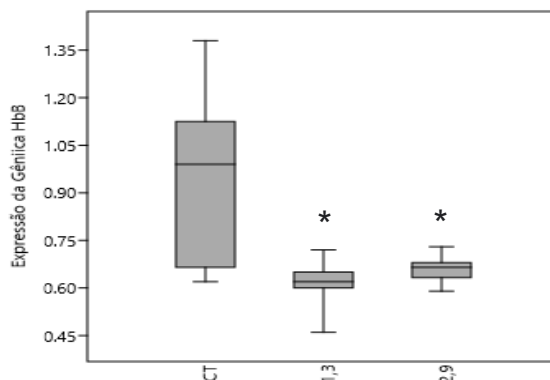
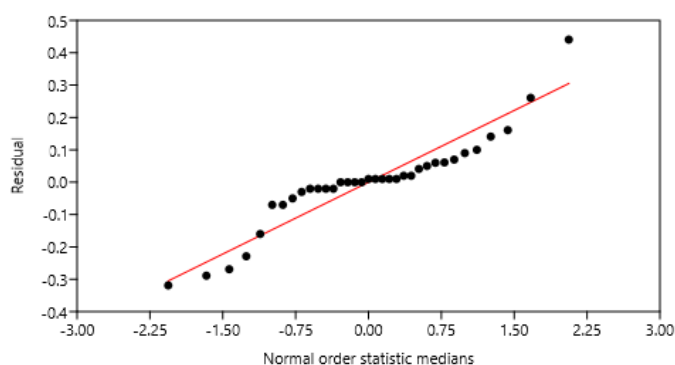


Figura 10: Resíduos indicando a normalidade das amostras.



Os antibióticos são agentes antimicrobianos criados para agir em sistemas biológicos, normalmente são solúveis e de difícil biodegradação, o que favorece sua persistência e bioacumulação ocasionando a contaminação dos ambientes terrestre e aquático (WOLLENBERGER; HALLING-SØRENSEN; KUSK, 2000).

A Ciprofloxacina é um antibiótico potente, de amplo espectro, eficaz contra a maioria das bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivo, sendo seu modo de ação reprimir a DNA girase (topoisomerase II) e a topoisomerase IV das bactérias impedindo a síntese do DNA, (CAMPOLI-RICHARDS et al., 1988) é um fármaco eficiente para uma grande variedade de infecções (DAVIS; MARKHAM; BALFOUR, 1996).

Devido seu modo de ação este fármaco pode atuar no DNA mitocondrial dos eucariontes. O DNA mitocondrial (mtDNA), responsável pela produção de ATP e

controle da diferenciação e morte celular, é parecido aos plasmídeos bacterianos com uma topoisomerase do tipo II, a topoisomerase 2 com duas isoformas Top2 $\alpha$  e Top2 $\beta$  que determinam o superenrolamento do mtDNA positiva ou negativamente. A CIP vai bloquear ou eliminação da topoisomerase Top2 $\beta$ , gerando uma concentração de mtDNA superenrolado positivamente que vai interromper a transcrição mitocondrial e a iniciação da replicação causando uma redução no número de cópias mtDNA, ação que vai ter consequências celular, impedindo sua diferenciação e multiplicação (HANGAS et al., 2018). Além disso, já foi descrita a atuação da CIP na quebra da fita dupla do DNA humano (BREDBERG; BRANT; JASZYK, 1991).

Os antibióticos também podem causar danos neurológicos ao se ligar as albuminas e competir com a bilirrubina, aumentando sua concentração no plasma atravessando a barreira hematoencefálica causando problemas como o kernicterus (THYAGARAJAN; DESHPANDE, 2014; WADSWORTH; SUH, 1988).

A hemoglobina é uma proteína respiratória que está presente em organismos de todo reino animal (OSMULSKI; LEYKO, 1986). Nos Chironomidae possuem grande afinidade ao oxigênio e são altamente polimórficas, apresentando funções de transporte e armazenamento de oxigênio além de atuarem na proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHOBANOV, 2004; OSMULSKI; LEYKO, 1986).

Os insetos possuem heterogeneidade de hemoglobinas e especificamente os *Chironomus* regulam diferentemente a expressão gênica de suas Hbs para manter seu metabolismo ou captar mais oxigênio em situações de hipóxia (OSMULSKI; LEYKO, 1986).

O uso da hemoglobina como um parâmetro molecular dos efeitos da CIP no *C. sancticaroli* não são encontrados na literatura. No entanto, podemos verificar alguns estudos analisando os efeitos de outros xenobióticos na expressão da hemoglobina de *Chironomidae*.

Como no presente estudo, Anderson et al. (2008) verificaram uma redução da expressão gênica da Hb no *Chironomus tentans* exposto ao herbicida atrazina. Da mesma forma, Lee et al. (2006) encontraram uma diminuição da expressão do gene da Hb em *Chironomus tentans* exposto a pesticida, concluindo que esta alteração pode causar problemas em níveis mais tardios da biologia do inseto, como por exemplo, redução do peso corporal fresco e seco do organismo.

A ciprofloxacina apresentou toxicidade no organismo teste ao reduzir a expressão gênica da hemoglobina B. A diminuição da expressão do gene da hemoglobina B no *C. sancticaroli* pode impactar o transporte e o armazenamento de oxigênio além de sua capacidade de proteção contra metabólitos contribuindo para o surgimento de estresse oxidativo e danos à biologia do *Chironomus sancticaroli*.

No nível bioquímico os parâmetros enzimáticos, AChE, Esterases alfa (EST- $\alpha$ ) e beta (EST- $\beta$ ) e CAT, foram analisados. A AChE não apresentou diferença significativa no *C. sancticaroli* exposto nas concentrações de 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CIP no ensaio subcrônico. O teste Shapiro-Wilki dados foram normais e homogêneos. Foi aplicado o teste de variância ANOVA – *one way* cujo  $p = 0,08616$  em seguida o teste de Tukey cujos valores foram de  $p = 0,1101$  para concentração de 1,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e de  $p = 0,1815$  para concentração de 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Figura 11: Atividade da AChE de larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica (11 dias): (CT) Controle, 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina.

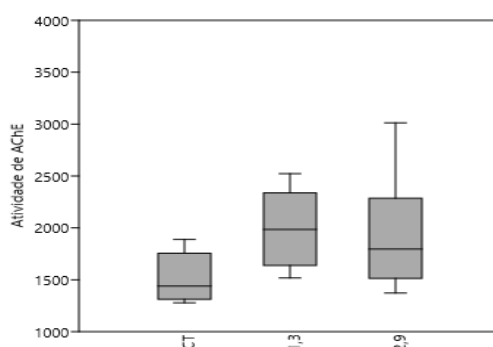
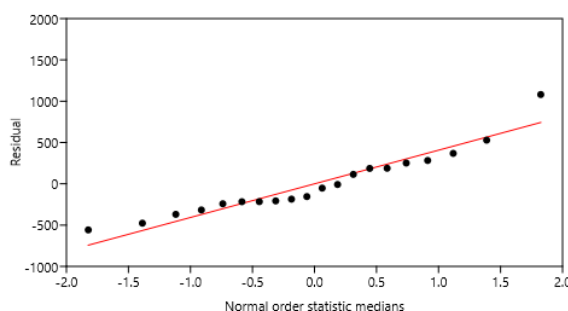


Figura 12: Gráfico de resíduos da AChE indicando a normalidade das amostras.



As enzimas do sistema de biotransformação EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  mostraram alterações significativas, apresentando um aumento de sua atividade na concentração 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CIP em exposição subcrônica (11 dias) em relação ao controle. Ambas atenderam os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade. Então foi realizado ANOVA – *one way* onde a EST- $\alpha$  apresentou  $p = 0,001176$  e a EST- $\beta$  exibiu  $p = 0,01055$ , ambas no tratamento 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e Tukey a posteriori apresentando valores de  $p = 0,0009118$  para EST- $\alpha$  e  $p = 0,009894$  para EST- $\beta$  ambas no tratamento de 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CIP.

Figura 13: Atividade das EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  de larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica (11 dias): (CT) Controle, 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina.

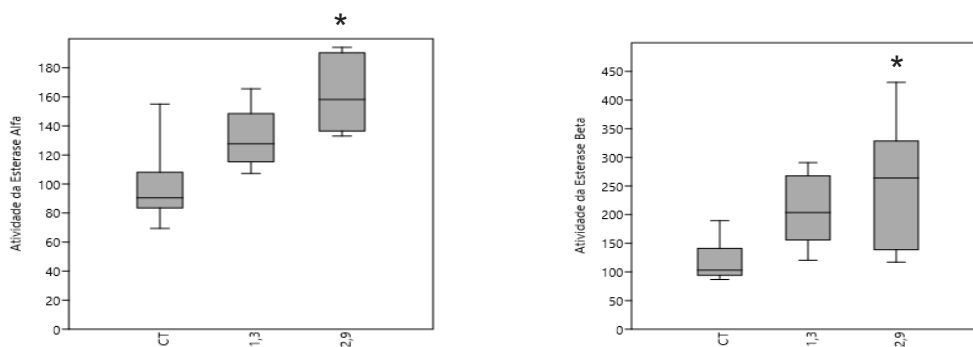


Figura 14: Gráfico de resíduos da EST- $\alpha$  indicando a normalidade das amostras.

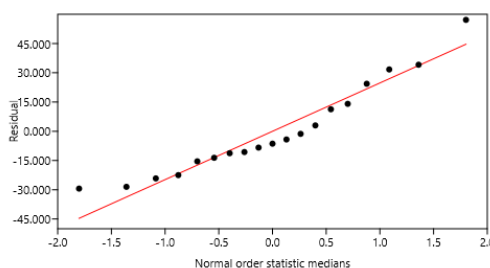
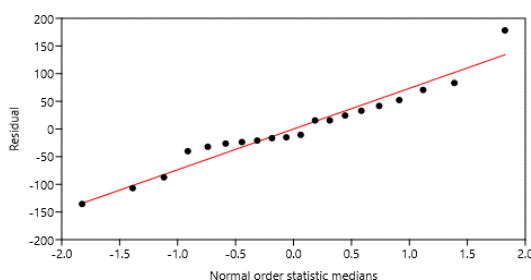


Figura 15: Gráfico de resíduos da EST- $\beta$  indicando a normalidade das amostras.



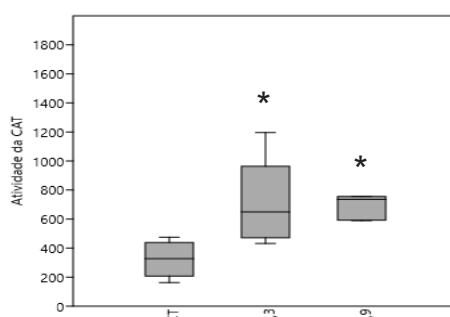
O sistema de biotransformação ou metabolismo é representado pelas fases I e II e vão realizar a desintoxicação do organismo através da metabolização das substâncias tóxicas. A fase I representa enzimas como as esterase alfa (EST- $\alpha$ ) e esterase beta (EST- $\beta$ ) importantes na metabolização de vários xenobióticos e compostos endógenos (CACCIATORE et al., 2013; VAN DER OOST et al., 2003)

Outras pesquisas também verificaram indução das esterases alfa e beta como Richardi al. (2018) constataram aumento da esterase alfa em tratamento agudo (48h) e aumento da esterase beta em exposição de 48 e 72h em *C. sancticaroli* expostos ao hidrocarboneto fenantreno. Resultado semelhante foi observado por Vicentini et al. (2017) que encontraram aumento das esterases alfa e beta no *C. sancticaroli* exposto ao hidrocarboneto aromático policíclico benzo(a)pireno concluindo que indução das esterases alfa e beta no *C. sancticaroli*, manifesta uma perturbação do metabolismo. Assim como, Moraes et al. 2019 verificaram no tratamento agudo aumento da atividade da EST- $\alpha$  e EST- $\beta$  e na exposição subcrônica aumento da atividade da EST- $\alpha$  no *C. sancticaroli* exposto ao antimônio na concentração de 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O aumento das esterases pode indicar a ação do sistema de biotransformação na desintoxicação do antibiótico pelo *C. sancticaroli*.

Em relação ao sistema de defesa antioxidante, a CAT apresentou um aumento significativo de atividade em ambas concentrações de CIP no ensaio subcrônico em relação ao controle. Os dados não cumpriram os pressupostos de normalidade e homocedasticidade então foi realizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com  $p = 0,002434$  e a posteriori o teste de Dunnett apresentando  $p = 0,003346$  no tratamento 1,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $p = 0,003935$  no tratamento 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Figura 16: Atividade da CAT de larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição subcrônica (11 dias): (CT) Controle, 1,3 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina.



As catalases fazem a dismutação do peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio (ERO), em oxigênio e água protegendo as células do estresse oxidativo (MATÉS, 2000; MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999). Como no presente estudo, pesquisas anteriores também verificaram uma indução da atividade da Catalase como Xie et al. (2019) que encontraram um aumento de 39% da CAT na menor concentração do tratamento com tetraciclina em *Chironomus riparius*. Assim como, Park et al., (2018) também verificaram um aumento da atividade da CAT em *Chironomus riparius*, porém em tratamento com sulfatiazol sugerindo uma atividade pró-oxidativa do antibiótico.

Ramesh et al. (2020) estudaram os efeitos especificamente da ciprofloxacina, nas concentrações de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , no peixe, *Cirrhinus mrigala*, e observaram um aumento da atividade da CAT. Assim como Rosas-Ramírez et al. (2022) observaram aumento da CAT em embriões do peixe, *Danio rerio*, expostos as concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  de ciprofloxacina.

Em *Chironomus riparius* substâncias tóxicas podem induzir enzimas antioxidantes pelo aumento de EROs ou por uma resposta adaptativa a exposição aguda ou crônica a substâncias tóxicas que geram EROs ou pelo contrário o sistema pode se mostrar deficiente e ocasionar uma redução do sistema de desintoxicação e prejudicar a síntese enzimática o que pode deixar os organismos vulneráveis a xenobióticos (RODRIGUES et al., 2016). Yisa et al. (2023) também concluíram que a CIP provoca elevação de peróxido de hidrogênio em *Daphnia magna*.

Em um estudo em vitro com células Jurkat a ciprofloxacina impediu a cadeia respiratória, alterou a quantidade de mtDNA e reduziu o potencial de membrana da

mitocôndria, reduzindo a entrada de cálcio na célula (KOZIEŁ; ZABŁOCKI; DUSZYŃSKI, 2006).

Uma possível razão do aumento da atividade da catalase pela ciprofloxacina talvez seja a interrupção da cadeia respiratória gerando radicais livre e EROs que vão acionar o sistema de defesa antioxidante *do C. sancticaroli* ativando assim a catalase. Assim como o aumento da atividade da catalase pode ser devido ao aumento de EROs gerado pela ação das esterases na metabolização do antibiótico ou ainda pela redução da expressão da hemoglobina que pode gerar estresse oxidativo.

Considerando a literatura e os resultados aqui encontrados existe a possibilidade de a CIP induzir estresse oxidativo no *Chironomus sancticaroli*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que a ciprofloxacina em concentrações ambientalmente relevantes afetou a regulação transcricional do gene da hemoglobina B e induziu distúrbio no metabolismo e no sistema de defesa antioxidante.

A resposta molecular apresentou uma redução da expressão gênica da HbB pela CIP. Os biomarcadores bioquímicos, as esterases alfa e beta e a CAT tiveram sua atividade enzimática aumentada indicando que sistema de biotransformação e o sistema de defesa contra o estresse oxidativo foram submetidos ao stress.

Esses efeitos podem indicar uma ação pró-oxidante e tóxica da ciprofloxacina para o *Chironomus sancticaroli*. Porém, mais estudos são necessários para verificar a ação da ciprofloxacina no *C. sancticaroli*, espécie de grande importância ecológica.

Este estudo mostrou a importância de se analisar as baixas concentrações desses xenobióticos em exposições, por maior período de tempo, em organismos aquáticos. Além disso, este resultado expõe a necessidade de se estabelecer níveis permissíveis deste xenobiótico no ambiente aquático, a implementação de tecnologia eficiente para remoção do poluente dos efluentes e da água e um controle mais rígido no consumo do antibiótico assim como de seu descarte.



## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology.**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- AL-SHAMI, S. A. et al. Evaluation of mentum deformities of *Chironomus* spp. (Chironomidae: Diptera) larvae using modified toxic score index (MTSI) to assess the environmental stress in Juru River Basin, Penang, Malaysia. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 177, n. 1–4, p. 233–244, jun. 2011.
- ALVES BAFFI, M. et al. Esterase profile in the postembryonic development of *Rhipicephalus microplus*. **Pesq. agropec. bras.**, v. 42, n. 8, p. 1183–1188, 2007.
- AMARAL, P. H. M.; ALVES, R. G. **Insetos Aquáticos: Bioindicadores de Impactos Antrópicos**. 1. ed. Juiz de Fora, MG: Edição dos autores, 2018.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. DE et al. Caracterização de diferentes fluidos empregados na usinagem de metais: Parte I: Perfil cromatográfico e espectrometria de massas. **Anais da Associação Brasileira de Química.**, v. 52, n. 2, p. 84–88, 2003.
- AMÉRICO, J. H. P. et al. Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. **RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 61–67, 2012.
- ANAND, U. et al. Potential environmental and human health risks caused by antibiotic-resistant bacteria (ARB), antibiotic resistance genes (ARGs) and emerging contaminants (ECs) from municipal solid waste (MSW) landfill. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.
- ANDERSEN, T. C.-R. A. S. MARTIN. Chironomidae (Diptera). Síntese de seu conhecimento. **Biodiversidade, taxonomia e biogeografia de artrópodes do México: Rumo a uma síntese de seu conhecimento.**, v. 2, p. 581–591, 2000.
- ANDERSON, T. D. et al. Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 2, p. 148–156, 31 jan. 2008.
- ANJALI, R.; SHANTHAKUMAR, S. Percepções sobre o estado atual de ocorrência e remoção de antibióticos em águas residuais por processos avançados de oxidação. **Revista de Gestão Ambiental**, v. 246, p. 51–62, 2109
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 1 nov. 2016.
- ARCHANA, G.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Ecotoxicological risk assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the

sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 9, 2017.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61–72, 2007.

ARMITAGE, P. D. (PATRICK D.); CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. (L. C. V). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. [s.l.] Chapman & Hall, 1995.

BAPTISTUCCI, C. B. Degradação do antibiótico ciprofloxacina em solução aquosa por meio de processos oxidativos avançado baseado em ozônio. p. 113, 2012.

BARROS, F. G. N.; AMIN, M. M. Água: um bem econômico de valor para o Brasil e o mundo 1. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 4, n. 1, p. 75–108, 2007.

BEEK, T. A. DER et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 823–835, 1 abr. 2016.

BERGTROM, G.; LAUFER, H.; ROGERS, R. FAT BODY: A SITE OF HEMOGLOBIN SYNTHESIS IN *CHIRONOMUS THUMMI* (DIPTERA). **The Journal of Cell Biology**, v. 69, p. 264–274, 1976.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Revista Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BOTTONI, P.; CAROLI, S.; CARACCILOLO, A. B. **Pharmaceuticals as priority water contaminants. Toxicological and Environmental Chemistry**, mar. 2010.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BREDBERG, A.; BRANT, M.; JASZYK, M. **Ciprofloxacin-Induced Inhibition of Topoisomerase II in Human Lymphoblastoid Cells** ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. [s.l: s.n.].Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>.

BROVINI, E. M.; RANGEL, A. L.; LIMA, L. *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) in ecotoxicology: laboratory cultures and tests. 2022.

BUSH, N. G. et al. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5662, 1 dez. 2020.

CACCIATORE, L. C.; VERRENGIA GUERRERO, N.; COCHÓN, A. C. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to

binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, p. 124–134, mar. 2013.

CAMPOLI-RICHARDS, D. M. et al. Ciprofloxacin. **Drugs**, v. 35, n. 4, p. 373–447, 18 abr. 1988.

CARVALHO, C. T. DE; JUNIOR, R. M.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 12, n. 2, p. 123–131, 2016.

CASTRO-CATALÀ, N. DE et al. Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 297–306, jan. 2016.

CHAPMAN, D. **Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring**. Second ed. London: E&FN Spon - Chapman & Hall, 1996.

CHATURVEDIAB, P. et al. Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. **Environmental Research**, v. 194, n. 110664, 2021.

CHERTEMPS, T. et al. A carboxylesterase, Esterase-6, modulates sensory physiological and behavioral response dynamics to pheromone in *Drosophila*. **BMC Biology**, v. 10, 21 jun. 2012.

CHOI, J.; ROCHE, H.; CAQUET, T. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* mg. (diptera, chironomidae) larvae: Potential biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 495–500, 2009.

COELHO, L.; AMORIM, A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 6, 2003.

CORREIA, L. C. S. **Contribuição para o conhecimento do gênero Chironomus Meigen, 1803 na região neotropical São Carlos**. [s.l: s.n.].

CRANSTON, P. S. Morphology. Em: ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S. & P. L. C. V. (Eds.). **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. London: Chapman & Hall, 1995. p. 13–30.

CRANSTON, P. S. Insecta: Díptera, Chironomidae. Em: YULE, C. M.; SEN, Y. H. (Eds.). **Invertebrados de água doce da região da Malásia**. Malásia: Academia de Ciências da Malásia., 2004.

CUZZIOL BOCCIONI, A. P. et al. Toxicity assessment at different experimental scenarios with glyphosate, chlorpyrifos and antibiotics in *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. **Chemosphere**, v. 273, 1 jun. 2021.

- DAHAN-MOSS, Y. L.; KOEKEMOER, L. L. Analysis of esterase enzyme activity in adults of the major malaria vector *Anopheles funestus*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.
- DALLA BONA, M. et al. Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 152–158, 1 mar. 2015.
- DAVIS, R.; MARKHAM, A.; BALFOUR, J. A. Ciprofloxacin. **Drugs**, v. 51, n. 6, p. 1019–1074, jun. 1996.
- DE ALBUQUERQUE, F. P. et al. Use of nontarget organism *Chironomus sancticaroli* to study the toxic effects of nanoatrazine. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 733–750, 1 maio 2021.
- DE BEL, E. et al. Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products. **Chemosphere**, v. 77, n. 2, p. 291–295, 2009.
- DIONÍSIO, R. et al. Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short- and long-term effects on *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 74, 1 fev. 2020.
- DOMINGUES, I. et al. Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: Potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. **Chemosphere**, v. 69, n. 1, p. 145–154, 2007.
- DORNFELD, C. B. et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Species in Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 1, p. 42–50, 15 jan. 2019.
- DU, B. et al. Impacts of long-term exposure to tetracycline and sulfamethoxazole on the sludge granules in an anoxic-aerobic wastewater treatment system. **Science of the Total Environment**, v. 684, 2019.
- EBERT, I. et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2786–2792, dez. 2011a.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, jul. 1961.
- FERNANDEZ, R. et al. The antibacterials ciprofloxacin, trimethoprim and sulfadiazine modulate gene expression, biomarkers and metabolites associated with stress and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquatic Toxicology**, v. 250, 1 set. 2022.

FONTE, E.; FERREIRA, P.; GUILHERMINO, L. Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. **Aquatic Toxicology**, v.180, p. 173–185, 1 nov. 2016.

GALASSO, M. et al. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 172, p. 264–272, 20 ago. 2021.

GAO, H. et al. **Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments**. **Environmental Pollution**. Elsevier Ltd., 1 jan. 2018.

GOLOVKO, O. et al. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. **Chemosphere**, v. 111, p. 418–426, 2014.

GOMES, M. F. et al. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (*Rhamdia quelen*) embryos. **Chemosphere**, v. 263, 1 jan. 2021.

GOMES, M. P. et al. Ciprofloxacin induces oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.): Implications for energy metabolism and antibiotic-uptake ability. **Journal of Hazardous Materials**, v. 328, p. 140–149, 2017a.

GOULART, M. & C. M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, v. 2, 2003.

HA, M. H.; CHOI, J. Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. **Chemosphere**, v. 71, n. 10, p. 1928–1936, maio 2008a.

HAN, J. et al. Effects of trimethoprim on life history parameters, oxidative stress, and the expression of cytochrome P450 genes in the copepod *Tigriopus japonicus*. **Chemosphere**, v. 159, p. 159–165, 1 set. 2016.

HANGAS, A. et al. Ciprofloxacin impairs mitochondrial DNA replication initiation through inhibition of Topoisomerase 2. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 18, p. 9625–9636, 2018.

HE, X. et al. Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1422–1431, 2011.

HERRERO, O. et al. Herrero 2014. **Revista de Toxicologia**, v. 31, n. 0212–7113, p. 176–186, 2014.

HUSSAIN, S.; NAEEM, M.; CHAUDHRY, M. N. Estimation of residual antibiotics in pharmaceutical effluents and their fate in affected areas. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 2, p. 607–614, 20 set. 2016.

IRFAN, S.; ALATAWI, A. M. M. Aquatic Ecosystem and Biodiversity: A Review. **Open Journal of Ecology**, v. 09, n. 01, p. 1–13, 2019.

JANECKO, N. et al. Implications of fluoroquinolone contamination for the aquatic environment-A review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 2647–2656, nov. 2016.

KARTHIGADEVI, G. et al. **Chemico-nanotreatment methods for the removal of persistent organic pollutants and xenobiotics in water – A review. Bioresource Technology**. Elsevier Ltd, 1 mar. 2021.

KITAMURA, R. S. A. et al. Sublethal biochemical, histopathological and genotoxicological effects of short-term exposure to ciprofloxacin in catfish *Rhamdia quelen*. **Environmental Pollution**, v. 300, 1 maio 2022.

KLEIN, E. Y. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. E3463–E3470, 2018.

KOVALAKOVA, P. et al. **Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. Chemosphere**. Elsevier Ltd, 1 jul. 2020.

KOZIEŁ, R.; ZABŁOCKI, K.; DUSZYŃSKI, J. Calcium Signals Are Affected by Ciprofloxacin as a Consequence of Reduction of Mitochondrial DNA Content in Jurkat Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1664–1671, maio 2006.

KUBISTA, M. et al. **The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine**, abr. 2006.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, abr. 2009.

LARSSON, D. G. J.; DE PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 3, p. 751–755, set. 2007.

LARSSON, D.; G., J.; FLACH, C. F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257–269, 2022.

LEE, S. B.; CHOI, J. Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 68, n. 1, p. 84–90, set. 2007.

LEE, S. M. et al. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1074–1081, 2006.

LENG, L. et al. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 238, p. 124680, jan. 2020.

LIM, J. M. et al. Impact of national interventions to promote responsible antibiotic use: A systematic review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 14–29, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LU, M.-C. et al. Occurrence and treatment efficiency of pharmaceuticals in landfill leachates. **Waste Management**, v. 55, p. 257–264, set. 2016.

MACHOWSKA, A.; LUNDBORG, C. S. Drivers of irrational use of antibiotics in Europe. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, 2019.

MAIER, K. J.; KOSALWAT, P.; KNIGHT, A. W. Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the Effect of Temperature on its Life History. **Environmental Entomology**, v. 19, n. 6, p. 1681–1688, 1 dez. 1990.

MANYI-LOH, C. et al. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

MARTÍNEZ-PAZ, P. et al. Endocrine-related genes are altered by antibacterial agent triclosan in *Chironomus riparius* aquatic larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 185–190, 1 jun. 2017.

MARTÍNEZ-PAZ, P. Response of detoxification system genes on *Chironomus riparius* aquatic larvae after antibacterial agent triclosan exposures. **Science of the Total Environment**, v. 624, p. 1–8, 15 maio 2018.

MARTINS, N. et al. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: Data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1167–1176, maio 2012.

MARTINS, R. T.; OLIVEIRA, V. C.; SALCEDO, A. K. Uso de insetos aquáticos na avaliação de impactos antrópicos em ecossistemas aquáticos. Em: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. (Eds.). **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. 1. ed. Manaus: Editora INPA, 2014. p. 117–129.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, 2000.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. ANTIOXIDANT ENZYMES AND THEIR IMPLICATIONS IN PATHOPHYSIOLOGIC PROCESSES. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 339–345, 1999.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, 11 jul. 2017

MORAIS, G. DOS S. et al. Biological, biochemical and genotoxic effects of Sb in the midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 176, p. 196–203, 30 jul. 2019.

NAIR, P. M. G.; PARK, S. Y.; CHOI, J. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 399–408, 2011.

NICACIO, G.; J. L. Chironomids as indicators in freshwater ecosystems: An assessment of the literature. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, p. 393–403, 2015.

NIE, X. et al. RESPONSE OF THE FRESHWATER ALGA CHLORELLA VULGARIS TO TRICHLOROISOCYANURIC ACID AND CIPROFLOXACIN. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 168, 2008.

NOGUEIRA, A. F.; NUNES, B. Effects of low levels of the antibiotic ciprofloxacin on the polychaete *Hediste diversicolor*: biochemical and behavioural effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, 1 nov. 2020.

NUNES, B. et al. Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic effects. **Water Science and Technology**, v. 2017, n. 3, p. 835–844, 17 jul. 2018.

OH, J. T.; EPLER, J. H.; BENTIVEGNA, C. S. A rapid method of species identification of wild chironomids (Diptera: Chironomidae) via electrophoresis of hemoglobin proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE). **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–13, 2014.

OKOYE, C. O. et al. Antibiotic resistance in the aquatic environment: Analytical techniques and interactive impact of emerging contaminants. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 96, 1 nov. 2022.

OLIVER, D. R. Life history of the Chironomidae. **ANNUAL REVIEWS OF ENTOMOLOGY**, v. 16, p. 211–230, 1971.

OSMULSKI, P. A.; LEYKO, W. REVIEW STRUCTURE, FUNCTION AND PHYSIOLOGICAL ROLE OF CHIRONOMUS HAEMOGLOBIN. **Biochem. Physiol. Vol**, v. 85, n. 4, p. 701–722, 1986.

OSPINA-PEREZ, E. M. et al. Descrição histológica de imaturos *Chironomus columbiensis* (Diptera: Chironomidae): uma potencial contribuição para o monitoramento ambiental. **Microscopy Research & Technique**, v. 82, n. 8, p. 1277–1289, ago. 2019.



PALAKSHA; SHAKUNTHALA, V. Variations in the esterase expression pattern with respect to different light regimes in *Drosophila agumbensis* and *Drosophila nagarholensis*. **Biological Rhythm Research**, v. 46, n. 4, p. 553–564, 4 jul. 2015.

PARK, K. et al. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 359–367, 2009a.

PARK, K.; KWAK, I. S. Disrupting effects of antibiotic sulfathiazole on developmental process during sensitive life-cycle stage of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 190, p. 25–34, 2018.

PEAKALL, D. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators**. 1st. ed. Hong Kong: Chapman & Hall, 1992. v. 1

PEAKALL, D. B. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. **Ecotoxicology**, v. 3, p. 157–160, 1994.

PELTZER, P. M. et al. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 51, p. 114–123, 1 abr. 2017.

PETERSEN, B. D. et al. Antibiotic drugs alter zebrafish behavior. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 242, 1 abr. 2021.

PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Quinolone antibiotics. **MedChemComm**, v. 10, n. 10, p. 1719–1739, 2019.

PIÑA, B.; CASADO, M.; QUIRÓS, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1145–1154, dez. 2007.

PINDER, L. C. V. BIOLOGY OF FRESHWATER CHIRONOMIDAE. **Annual Review of Entomology**, v. 31, p. 1–23, 1986b.

POLIANCIUC, S. I. et al. Antibiotics in the environment: causes and consequences. **Medicine and Pharmacy Reports**, v. 93, n. 3, p. 231–240, 2020.

PORINCHU, D. F.; MACDONALD, G. M. The use and application of freshwater midges (Chironomidae: Insecta: Diptera) in geographical research. **Progress in Physical Geography: Earth and Environment**, v. 27, n. 3, p. 378–422, set. 2003.

PRADO, C. C. A. et al. Toxicological effects caused by environmental relevant concentrations of ketoconazole in *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) larvae evaluated by oxidative stress biomarkers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 264, p. 109532, fev. 2023.

PRAT, N.; DAVID GONZÁLEZ-TRUJILLO, J.; OSPINA-TORRES, R. Clave para la determinación de exuvias pupales de los quironómidos (Diptera: Chironomidae) de

ríos altoandinos tropicales. **Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN**, v. 62, n. 4, p. 1385–1406, 2014.

RAINYER, Í. et al. BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EM AMBIENTE AQUÁTICO: EFEITO NA PRODUÇÃO ANIMAL (Antibiotic resistant bacteria in aquatic environment: effect on animal production). **Ciência Animal.**, v. 32, n. 1, p. 84–99, 2022.

RAKOTONDRAVELO, M. L. et al. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 360–366, out. 2006.

RAMESH, M. et al. Responses of *Cirrhinus mrigala* to second-generation fluoroquinolone (ciprofloxacin) toxicity: Assessment of antioxidants, tissue morphology, and inorganic ions. **Environmental toxicology.**, v.36, n. 5, p. 887–902, 2020.

REBECHI, D.; R. V. S; V. M.; ET AL. Low malathion concentrations influence metabolism in *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae) in acute and chronic toxicity tests. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, p. 296–301, 2014.

REBECHI-BAGGIO, D. et al. Factors that alter the biochemical biomarkers of environmental contamination in *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 4, p. 341–346, 1 out. 2016.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 93, p. 106–117, fev. 2014.

RICHARDI, V. S. et al. Determination of larval instars in *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, abr. 2013.

RICHARDI, V. S. et al. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae). **Environmental Pollution**, v. 242, p. 277–287, 1 nov. 2018.

RICHARDI, V. S.; NAVARRO-SILVA, MARIO; VICENTINI, MAIARA; REBECHI, DÉBORA; FÁVARO, L. F. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticarloi* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 240–250, 2015.

RODRIGUES, S. et al. Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*. **Science of the Total Environment**, v. 545–546, p. 591–600, 1 mar. 2016.

RODRIGUES, S. et al. Oxytetracycline effects in specific biochemical pathways of detoxification, neurotransmission and energy production in *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 100–108, 30 nov. 2018.

ROSAS-RAMÍREZ, J. R. et al. Teratogenic effects induced by paracetamol, ciprofloxacin, and their mixture on *Danio rerio* embryos: Oxidative stress implications. **Science of the Total Environment**, v. 806, 1 fev. 2022.

SARKAR, A. et al. **Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring**. Ecotoxicology. **Anais...** maio 2006.

SCHWARZBAUER, J. et al. Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill. **Water Research**, v. 36, n. 9, p. 2275–2287, maio 2002.

SHOBANOV, N. A. COMPARATIVE AND ONTOGENIC BIOCHEMISTRY Heterogeneity and Heterofunctionality of Hemoglobins in Bloodworms (Diptera, Chironomidae). **Translated from Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii**, v. 40, n. 4, p. 311–315, 2004.

SILVA DE ASSIS, H. C. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. [s.l.] University of Berlin, Berlin. Germany., 1998.

SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios**. Jaguariúna SP: [s.n.]. Disponível em: <[www.cnpma.embrapa.br](http://www.cnpma.embrapa.br)>

SIQUEIRA; TRIVINHO-STRIXINO, S. Diversidade de Chironomidae (Diptera) em dois córregos de baixa ordem na região central do Estado de São Paulo, através da coleta de exúvias de pupa Tadeu. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 4, p. 531–534, dez. 2005.

SOUZA, M, V, N; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A, D; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, p. 13–18, 2004.

STRIXINO, G.; STRIXINO, S. T. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, p. 177–180, 1985.

STRIXINO, S. T.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p. 183–189, 1982.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 583–599, 1990.

THYAGARAJAN, B.; DESHPANDE, S. S. Cotrimoxazole and neonatal kernicterus: a review. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 121–129, 7 abr. 2014.  
TOKESHI, M. **On the evolution of commensalism in the Chironomidae**. **Freshwater Biology**, 1993.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Díptera, Nematocera) from São Paulo State, Southeast of Brazil. **Biota Neotrop**, v. 11 1a, 2011.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região neotropical (Díptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 33(2), p. 207–216, set. 1989.

VALLE, D. et al. **Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti***. Rio de Janeiro and Distrito Federal, Brazil: Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde., 2006.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015a.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 19 ago. 2003.

VASCO, G. et al. BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA QUALIDADE AMBIENTAL DE AMBIENTES AQUÁTICOS. **10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**, 2016.

VICENTINI, M. et al. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 6, p. 658–665, 1 dez. 2017.

WADSWORTH, S. J.; SUH, B. **In Vitro Displacement of Bilirubin by Antibiotics and 2-Hydroxybenzoylglycine in Newborns** **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>.

WAGIL, M. et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 1006–1013, 5 set. 2014.

WALSHE, B. M. The feeding habits of certain larvae (ubfamily Tendipedinae). **Jornal of Zoology**, v. 121, p. 63–79, 1951.

WANG, J. et al. Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) in municipal wastewater treatment plant: An overview. **Science of The Total Environment**, v. 744, n. 140997, 2020.

WETZSTEIN, H. G.; SCHMEER, N.; KARL, W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4272–4281, nov. 1997.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 723–730, abr. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>.

XIE, Z. et al. Bioconcentration, metabolism and the effects of tetracycline on multiple biomarkers in *Chironomus riparius* larvae. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 1590–1598, 1 fev. 2019a.

XIE, Z. et al. Bioconcentration and ecotoxicity of sulfadiazine in the aquatic midge *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 66, p. 69–74, 1 fev. 2019b.

YANG, Q. et al. Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 7376–7416, 2021a.

YISA, A. G. et al. Immobilization, oxidative stress and antioxidant response of *Daphnia magna* to Amoxicillin and Ciprofloxacin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 104078, mar. 2023.

ZÁMOCKÝ, M. et al. **Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 15 set. 2012.

ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 72, p. 19–66, 1999.

ZENKER, A. et al. **Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment**. **Journal of Environmental Management** Academic Press, 15 jan. 2014.

ZHANG, Q.; CHENG, J.; XIN, Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 707–719, 1 maio 2015.

ZHAO, H. et al. Environmentally relevant concentration of cypermethrin or/and sulfamethoxazole induce neurotoxicity of grass carp: Involvement of blood-brain barrier, oxidative stress and apoptosis. **Science of the Total Environment**, v. 762, 25 mar. 2021.

ZHAO, R. et al. Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics. **Water Research**, v. 151, p. 388–402, mar. 2019.

ZHOU, T. et al. **A review on microalgae-mediated biotechnology for removing pharmaceutical contaminants in aqueous environments: Occurrence, fate, and removal mechanism**. **Journal of Hazardous Materials** Elsevier B.V., 5 fev. 2023.

