Universidade de São Paulo

Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Bruno Abdon Inácio de Sousa

Avaliação toxicológica de misturas dos medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) em *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Piracicaba

2013

Bruno Abdon Inácio de Sousa

Avaliação toxicológica de misturas dos medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) em *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura de São Paulo para a obtenção de título de mestre em Ciências

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Sousa, Bruno Abdon Inácio de

Avaliação toxicológica de misturas dos medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) em *Daphnia magna* / Bruno Abdon Inácio de Sousa; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
64f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agentes antimicrobianos 2. Farmacologia veterinária 3. Interação de medicamentos 4. Invertebrados de água doce 5.Toxicologia ambiental I. Título

CDU574.64 : 661.12

Dedicatória

Dedico aos meus pais,

Luis Ubirajara I. de Sousa e Mary Abdon Sousa,

por todo apoio, carinho, amor e confiança.

A minha noiva Andrea, por toda compreensão, carinho, amor e incentivo.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências, pela oportunidade;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida;

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pela orientação e ensinamentos durante todo o mestrado;

A Bioagri pelo apoio e suporte a minha pesquisa;

A Josélia Sesso Perina pela ajuda e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus pais pelo carinho e apoio incondicional desde o primeiro dia em que eu fui aceito neste programa de Pós-graduação;

Aos meus irmãos e a minha irmã que mesmo não sabendo exatamente o que eu faço sempre me apoiaram e me incentivaram;

A todos os colegas do laboratório, Carol, Jeane, Leila, Rafael, Neide, Marcela, Franz, Sergio e Grazi por todas as risadas e pelos momentos juntos;

As estagiárias: Luana, Thais, Ariadne, Carol e Jessica pela ajuda indispensável e companhia;

Aos técnicos de laboratório Rodrigo e Dorelli pela ajuda na realização desse trabalho;

Ao estatístico Ricardo de Olinda pela colaboração e presteza para analisar os meus resultados;

Ao Prof. Dr. Christian Blaise pela ajuda na interpretação dos meus dados;

Aos membros da banca de defesa de mestrado pela disponibilidade.

O meu muito obrigado a todos!

“Uma vida não questionada não merece ser vivida.”

(Platão)

RESUMO

SOUSA, B.A.I. **Avaliação toxicológica de misturas dos medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) em *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea)**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Esse trabalho teve como objetivo o estudo da toxicidade aguda e crônica da ação isolada e de misturas binárias de três medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) para o organismo teste *Daphnia magna*. A toxicidade aguda da enrofloxacina determinada foi de CE_{50} – 54.36 mgL^{-1}, da monensina CE_{50} – 15.11mgL^{-1} e da sulfametazina CE_{50} – 183.80 mgL^{-1}. Para os ensaios de toxicidade crônica foram determinados 3 “endpoints” (sobrevivência, reprodução e tamanho do adulto) e foi determinado o CEO para a enrofloxacina de 0,33 mgL^{-1}, da monensina 0,09 mgL^{-1} e da sulfametazina de 6,8 mgL^{-1}. Para fazer uma comparação entre os testes das substâncias isoladas e das misturas binárias foi utilizado o conceito de unidade tóxica (UT), essa comparação foi feita através da soma das UT dos ensaios individuais e comparando com os resultados dos ensaios de misturas para determinar se houve ação sinérgica, aditiva ou antagônica. O ensaio agudo de mistura monensina/enrofloxacina apresentou ação sinérgica já os ensaios monensina/sulfametazina e sulfametazina/enrofloxacina apresentaram ação antagônica. Os ensaios crônicos de mistura monensina/enrofloxacina e monensina/sulfametazina apresentaram ação sinérgica, porém não foram dose-dependente e o ensaio sulfametazina/enrofloxacina apresentou ação antagônica. Com base nesse estudo é possível concluir que a mistura desses medicamentos interfere na sua toxicidade, podendo causar efeitos sinérgicos ou antagônicos.

Palavras-Chaves: Microcrustáceo. Efeito sinérgico. Efeito antagônico. Antimicrobiano. Ensaios ecotoxicológicos de misturas.

ABSTRACT

SOUSA, B.A.I.**Toxicological evaluation of mixtures of veterinary drugs (Monensin, Sulfamethazine and Enrofloxacin) in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea).**2013. 64f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

This work aims to study the acute and chronic toxicity of the isolated and binary mixtures action of three veterinary drugs (Monensin, Sulfamethazine and Enrofloxacin) for the test organism *Daphnia magna*. The determined acute toxicity of enrofloxacin was EC50 - 54.36 mgL^{-1}, monensin EC50 - 15.11 mgL^{-1} and sulfamethazine EC50 - 183.80 mgL^{-1}. In the chronic toxicity tests were determined 3 endpoints (survival, reproduction and adult size) and the LOEC determined for enrofloxacina was 0.33 mgL^{-1}, monensin 0.09 mgL^{-1} and sulfamethazine 6.8 mgL^{-1}. To make a comparison between the tests of isolated substances and binary mixtures it was used the concept of toxic unit (TU), this comparison was made by adding the UT of individual studies and comparing the test results of mixtures to determine whether there was a synergistic action, additive or antagonistic. The acute mixture assay monensin/enrofloxacin showed synergistic action yet the assays monensin/sulfamethazine and sulfamethazine/enrofloxacin showed antagonistic action. The chronic mixing assays monensin / enrofloxacin and monensin / sulfamethazine showed synergistic action, but were not dose-dependent and testing sulfamethazine / enrofloxacin present antagonistic action. Based on this study it can be concluded that the mixing of these drugs interferes with its toxicity, and may cause synergistic or antagonistic effect.

Keywords: Microcrustacean. Synergistic effect. Antagonistic effect. Antimicrobial. Ecotoxicological testing of mixtures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da Enrofloxacina 24

Figura 2 - Fórmula estrutural da Sulfametazina 25

Figura 3 - Fórmula estrutural da Monensina 26

Figura 4 - Organismo Teste: *Daphnia magna* 32

Figura 5 - Cultivo dos organismos teste *D. magna* 37

Figura 6 - Incubadora utilizada no cultivo das *D. magna* 37

Figura 7 - Cultivo da alga *Pseudokirchneriella subcaptata* para alimentação dos cultivos de *D. manga* 41

Figura 8 - Resultados das variações dos tamanhos das *D. magna* dos ensaios crônicos isolados. 50

Figura 9 - Resultados das variações dos tamanhos das *D. magna* dos ensaios crônicos de mistura de antimicrobianos. 52

Figura 10 - Taxa líquida de reprodução (R0) e taxa de crescimento populacional (r) de *D. magna* após 21 dias de exposição aos antimicrobianos. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das soluções estoque para obtenção da água de diluição (meio M4) 39

Tabela 2 - Preparo das soluções estoque para obtenção do meio LC oligo..... 40

Tabela 3 - Classificação da toxicidade aguda de substâncias em relação a organismos aquáticos..... 42

Tabela 4 - Toxicidade aguda dos antimicrobianos testados individualmente para *D. magna* 45

Tabela 5 - Toxicidade aguda dos antimicrobianos testados em misturas para *D. magna*..... 46

Tabela 6 - Toxicidade crônica dos antimicrobianos testados individualmente com *D. magna*..... 47

Tabela 7 - Toxicidade crônica para os antimicrobianos testados em misturas com *D. magna*..... 51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. REVISÃO DE LITERATURA 23
2.1 Fármacos Veterinários 23
2.1.1 Enrofloxacina 23
2.1.2 Sulfametazina 25
2.1.3 Monensina 26
2.2 Fármacos no ambiente 27
2.3 Degradação 29
2.4 Toxicidade 29
2.5 Organismo teste 31
2.6 Ecotoxicologia 32
3. OBJETIVOS 35
3.1 Objetivo geral 35
3.2 Objetivos específicos 35
4. MATERIAL E MÉTODOS 36
4.1 Material teste 36
4.2 Cultivo das *D. magna* 36
4.3 Ensaios toxicológicos 41
4.3.1 Ensaio de toxicidade Aguda 41
4.3.2 Ensaio de toxicidade Crônica 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
6. CONCLUSÃO 54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

INTRODUÇÃO

Nos Estados Unidos no ano de 2004 foram comercializados 9,8 milhões de toneladas de antibióticos. Os principais grupos são os ionóforos com 4,28 milhões de toneladas, as tetraciclinas com 2 milhões de toneladas, as cefalosporinas, os macrolideos, as lincosamidas, a estreptomicina, e outras classes com 1,95 milhões de toneladas e sulfonamidas e penicilinas, com 54 milhões de toneladas (KÜMMERER, 2008). Estimativas indicam que entre 100 e 200 x 10^6 Kg destes compostos são consumidos no mundo (WISE, 2002).

Segundo Kümmerer (2008) em 1996, das 10.200 T de antibióticos usados nos Estados Unidos, 50% foram empregadas tanto na medicina veterinária quanto como promotores de crescimento na saúde animal.

Os antibióticos têm sido utilizados em grandes quantidades nas criações animais. Muitas dessas moléculas não são totalmente metabolizadas no organismo animal e seus resíduos têm sido detectados em amostras de solo, água superficial e subterrânea. A ocorrência desses resíduos no ambiente pode favorecer a resistência de microrganismos aos agentes antibióticos, além de causar problemas de ordem toxicológica a determinados organismos vivos. Os antibióticos de uso veterinário são, no geral, representados por moléculas anfóteras, com vários grupos funcionais ionizáveis (diferentes valores de pKa), massas molares bastante variáveis (172 a 916 g mol^{-1}) e baixos potenciais de volatilização (pressão de vapor < 1,1 x 10^{-11} mm Hg)(REGITANO; LEAL, 2011).

Muitos antibióticos usados na indústria de produção animal são fracamente adsorvidos no sistema digestivo do animal, resultando na excreção de 30-90% do composto (ALCOCK et al., 1999).Além do mais, os metabólitos dos antibióticos ainda podem ser bioativos e podem ser transformados novamente em seu composto original após a excreção.

Os antibióticos são substâncias que em pequenas doses são capazes de inibir o crescimento ou a sobrevivência de microorganismos sem afetar o hospedeiro (BIER, 1980). Estes compreendem algumas classes de compostos biologicamente ativos (β-lactanos e tetraciclinas) ou sintéticos denominados antimicrobianos (sulfonamidas e quinolonas).

Com isso uma porcentagem significativa do antibiótico administrado pode ser excretada para o meio ambiente em sua forma ativa (BERGER et al., 1986). Um exemplo disso são as sulfametazinas, que logo após a administração se associam ao açúcar presente no fígado inativando-se. Porém logo após a sua excreção microorganismos presentes no meio rapidamente degradam esse açúcar deixando esse composto na sua forma bioativa novamente (RENNER, 2002).

Segundo Witte (1998) os antibióticos podem ser disseminados para o meio ambiente tanto de fontes humanas quanto de agropecuária, incluindo exceções, descarte de medicamentos antigos ou fora de validade, descargas de estações de tratamento de água, vazamentos de caixas sépticas e estruturas de armazenamento de descarte provenientes da agricultura. Outros caminhos para a disseminação são através da aplicação de descarte humano e agropecuário em terra, lixiviação de superfícies e zonas de transportes insaturados. Uma vez no ambiente, como qualquer substância orgânica, sua toxicidade dependerá de suas propriedades físico-químicas, condições climáticas, tipo de solo e uma variedade de fatores ambientais. Se o antibiótico não for eficientemente degradado, é possível que esses resíduos possamfavorecer na manutenção ou desenvolvimento de populações microbianas resistentes.

Antibióticos de uso veterinário foram monitorados em águas superficiais (DAUGHTON; TERNES, 1999; KOLPIN et al., 2002) e detectados em baixas concentrações ($ηgL^{-1}$/$μgL^{-1}$) em vários compartimentos dos ecossistemas aquáticos e terrestres. A ocorrência de antibióticos em águas para consumo humano direto é pouco investigada (SEGURA et al., 2009) o que talvez possa ser explicado pela necessidade de limites de quantificação muito baixos para determinação de resíduos ($< 1\ ηgL^{-1}$).

Enquanto é possível que antibióticos encontrem seu caminho até o meio ambiente a partir de enumeras fontes, se existe ou não efeitos adversos para humanos, ecossistemas terrestres e aquáticos ainda não são bem estudados. Apenas no começo desse século a problemática de produtos farmacêuticos nos ambientes emergiu como um importante tópico de pesquisa (JENSEN, 2001; DIETRICH et al., 2002).

Os antibióticos, outrora considerados drogas milagrosas do século 20, se tornaram contaminantes ambientais de emergente preocupação no século 21. Estudos mostraram que esses compostos são persistentes e suficientemente moveis

para serem transportados de campos, áreas agrícolas e centros urbanos para águas naturais (SEGURA et al., 2009).

Um aspecto a considerar é o de que a exposição toxicológica aos agentes antimicrobianos não responde, necessariamente, a uma relação dose-resposta linear, entretanto a exposição de diversos organismos a concentrações extremamente baixas, por longo período de tempo, pode atuar sobre a capacidade da fertilidade e da reprodução (COLLIER, 2007).

Segundo Sarmah et al. (2006) são poucos os estudos de toxicidade crônica de antibióticos veterinários em diferentes espécies, pois como é sabido os efeitos adversos produzidos podem variar com o toxico e com as espécies de organismos (RAND, 1995). Fent (2008) diz que a toxicidade crônica ainda é pouco conhecida, e por isso, avaliações de risco ecológico baseiam somente em ensaios de toxicidade aguda apesar de suas intrínsecas limitações.

São muitos os trabalhos que demonstram efeitos provocados por interações sinérgicas, antagônicas, de potenciação e de adição de contaminantes orgânicos e inorgânicos sobre muitas comunidades da biota. Porém devido à complexidade dos processos envolvidos, não se dispõe ainda de explicações claras sobre os efeitos causados por tais interações. A exposição da biota a misturas de contaminantes pode levar a interações toxicológicas resultantes da exposição de dois ou mais contaminantes, gerando uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente da esperada pela ação dos contaminantes isolados (RAND et al., 1995).

Uma grande variedade de diferentes substâncias é usada simultaneamente na medicina humana e veterinária em uma mesma área, fármacos estão presentes como misturas multicomponentes no meio ambiente como, por exemplo, na aquicultura. É essencial investigar se misturas de fármacos interagindo, trazem maiores efeitos sobre o ambiente do que cada composto individualmente (WILSON et al., 2004).

As avaliações de risco de moléculas ainda se baseiam na análise de compostos individuais. Entretanto é sabido que os fármacos, entre estes os antibióticos veterinários, não são encontrados como substâncias puras nos compartimentos ambientais, logo a mistura de compostos pode exibir diferentes efeitos daqueles observados em compostos isolados (SILVA et al., 2002).

Segundo Ajit et al. (2006) uma importante questão a ser considerada é a relação entre os testes padrões adotados e os efeitos mais sutis a longo

prazo de compostos misturados no ambiente, para que decisões racionais possam ser estabelecidas sobre a adição de um composto desconhecido a um já existente no meio. Contudo o Brasil necessita de informações sobre a ocorrência de resíduos de ingredientes farmacêuticos ativos e seus metabólitos em Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) (REIS et al., 2007).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina as concentrações máximas permitidas, de substâncias tóxicas, no sedimento e corpos hídricos. Porém os antibióticos não estão contemplados na resolução 357 que estipula essas concentrações (CONAMA, 2005). Juntamente com a falta de fiscalização da venda desses fármacos veterinários, que no Brasil podem ser adquiridos sem a necessidade de uma prescrição médica, causando uma grande preocupação em relação ao uso indiscriminado dessas substâncias.

A falta de informação sobre a toxicidade crônica dos medicamentos veterinários sobre diferentes espécies de organismos, a falta de conhecimento do impacto que as misturas desses compostos podem causar sobre o ambiente e que as avaliações de risco ecológico sejam fundamentadas apenas em ensaios de toxicidade aguda leva a um entendimento muito limitado da dinâmica desses medicamentos.

Logo esse trabalho se propôs a analisar a toxicidade aguda e crônica de três medicamentos veterinários (enrofloxacina, monensina, sulfametazina) em relação ao microcrustáceo *Daphnia magna* e avaliar o impacto de misturas binárias entre eles para o mesmo organismo.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fármacos Veterinários

Uma série de ingredientes veterinários está aprovada para atender as mais diversas demandas da saúde animal, entre estes se encontram: anti-helmínticos, analgésicos, anti-neoplásticos, antiinflamatórios, anti-histamínicos, meio de contraste de raio-X, desinfetantes, promotores de crescimento, imunoestimulantes, esteróides, anestésicos, sedativos, tranqüilizantes, emulsificantes, suplementos nutricionais, diuréticos, antibióticos entre outros.

Apesar do mercado de antibióticos direcionados à saúde animal seja de apenas 5% dos fármacos, o mesmo movimentou cerca de 18,6 bilhões de dólares em 2009 (IFAH, 2011). Ainda segundo o mesmo autor o grupo dos antibióticos corresponde a 26,5%, quando incluídos aos aditivos medicinais alimentares, sendo os bovinos a classe que mais consome antibióticos seguidos pelas aves e suínos.

O Brasil possui o maior rebanho bovino e é um dos grandes produtores de frango,sendo também possuidor da segunda maior população de animais de companhia, avaliada em 40 milhões, com a indústria veterinária faturando no ano de 2005 cerca de 917 milhões de dólares (BNDES, 2007).

Os antibióticos podem ser metabolizados durante a Fase I ou Fase II, sendo a primeira de oxidação, redução ou hidrólise, em que os metabolitos são freqüentemente mais reativos e algumas vezes mais tóxicos do que a forma original. A Fase II envolve reações de conjugação que resulta na inativação do composto (HALLING-SØRENSEN et al., 1998).

2.1.1 Enrofloxacina

As principais fluoroquinolonas utilizadas em espécies produtoras de alimentos são danofloxacina, enrofloxacina, flumequina, marbofloxacina e sarafloxacina.

As quinolonas fazem partes de uma família de drogas sintéticas (de amplo espectro) antimicrobianas que compõem quatro gerações. As fluoroquinolonas são ativas contra algumas bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli*, Enterobacter, Klebsiella, Pasteurella, Proteuse e de Salmonella. Estes agentestambém são ativos contra algumas bactérias Gram-positivas como clamídia, cobacteria e micoplasma. Em algumas regiões, o uso de fluoroquinolonas está aprovado para o tratamento da colibacilose de frangos e perus, cólera aviária em perus, e doença respiratória bovina (REEVES, 2012).

Para a enrofloxacina (Figura 1), existe uma consideração adicional, em relação à farmacocinética e dos resíduos metabólicos, na medida em que esse medicamento é metabolizado no fígado ele gera um metabolito microbiologicamente ativo, a ciprofloxacina. Em bovinos as taxas de conversão de enrofloxacina para a ciprofloxacina, são de 25 e 41%, respectivamente. Os resíduos são medidos como a soma da enrofloxacina e ciprofloxacina. Em aves, porcos e peixes, quantidades muito menores de ciprofloxacina são formadas. Contudo, em frangos, resíduos de ciprofloxacina foram detectados 12 dias após a administração da enrofloxacina (ANADÓN et al., 1995).

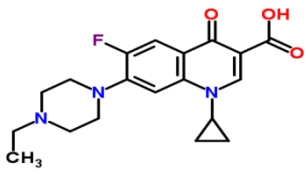

Figura 1 - Fórmula estrutural da Enrofloxacina

Dois membros do grupo, enrofloxacina e sarofloxacin, eram usados em aves, mas agora foram proibidos nos Estados Unidos e na Austrália por causa de preocupações com aumento da resistência das bactérias Campylobacter e Salmonella (LEES;TOUTAIN, 2012).

2.1.2 Sulfametazina

As sulfonamidas foram os primeiros agentes quimioterápicos a serem empregados sistemicamente para a prevenção ecura de infecções bacterianas em seres humanos.

A introdução das sulfonamidas nos anos 1930 e benzilpenicilina na década de 1940 revolucionou completamente a medicina, reduzindo a morbidade ea mortalidade de doenças infecciosas. Hoje em dia, os medicamentos antimicrobianos são utilizados em animais produtores de alimentos para tratar e prevenir doenças e para aumentar a taxa de crescimento e eficiência alimentar. O seu uso é fundamental para a saúde animal e bem-estar e para a economia da indústria pecuária (GIGUERE, 2006a).

Em comparação com a maioria das classes de drogas antimicrobianas, a utilização de sulfonamidas e sulfonamidas potenciadas em medicina veterinária é elevada. As sulfonamidas são utilizadas para tratar ou prevenir infecções sistémicas ou locais agudas, incluindo Actin obacilose, coccidiose, mastite, metrite, colibacilose, pododermatite, poliartrite, infecções respiratórias e toxoplasmose. As sulfonamidas são também utilizadas no tratamento de “foulbrood” americana doença causada *Paenibacilluslarvae* e “foulbrood” europeia doenças causadas por *Melissococcuspluton* que afetam as abelhas (REEVES, 2012).

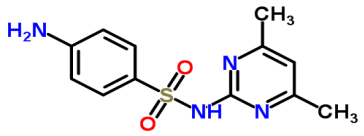

Figura 2 - Fórmula estrutural da Sulfametazina

Relativamente poucas sulfonamidas estão atualmente (a partir de 2011) aprovadas para uso em espécies animais produtoras de alimentos, um desses medicamentos aprovados é a sulfametazina (Figura 2). Isto é atribuído a vários

fatores, incluindo as preocupações toxicológicas associadas com algumas sulfonamidas e da falta de dados contemporâneos para apoiar os usos históricos de outras sulfonamidas (REEVES, 2012).

2.1.3 Monensina

A classe poliéter ionóforo é um grupo único de compostos com alta potência contra uma variedade de doenças infecciosas, incluindo bactérias, protozoários e vírus. Esta classe de antibióticos inclui lasalocide, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e semduramicina. Estes medicamentos são utilizados exclusivamente na veterinária por causa de suas atividades antibacterianas e anticoccidiano. O primeiro ionóforo a ser descoberto foi lasalocida em 1951. Essa droga, que é um produto de fermentação de *Streptomyces lasaliensis*, é um poliéter ionóforo bivalente. Em 1967 ocorreu a descoberta de monensina (Figura 3), um produto de fermentação de *Streptomyces cinnamonensis* e do ionóforo poliéter monovalente. Eles são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivasporque a camada de peptidoglicano é porosa, permitindo-lhespassar para chegar à membrana citoplasmática, onde se dissolvem rapidamente na membrana(RUSSELL, 1987).

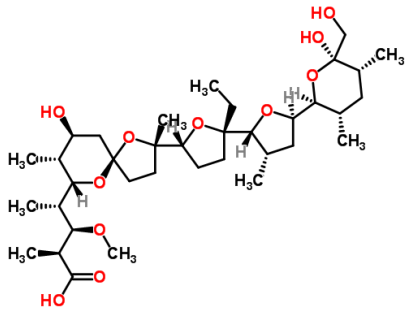

Figura 3 - Fórmula estrutural da Monensina

Como os ionóforos afetam seletivamente os organismos Gram-positivos, a microbiota ruminal desloca em direção a uma população mais Gram-negativa e resulta em alteraçõesnos padrões da fermentação da dieta, com isso as proporçõesde ácido acético e ácido butírico nos ácidos graxos voláteissão

reduzidos, enquanto que a proporção de ácido propiónico é aumentada. O resultado é a redução das perdas de energiapor unidade de alimento consumido (BERGEN, 1984), gerando uma quantidade de emissão de metano menor para o ambiente.

A administração de monensina para o gado, por exemplo, resulta em melhorias no ganho de peso de ate 10% e diminuição no consumo de alimentos de ate 6%. Ionóforos também têm um profundo impacto sobre a retenção de nitrogênio no rúmen, um fenômeno conhecido como efeito “protein-sparing”. A monensina é usada em gado confinado para reduzir a incidência de acidose aguda e subaguda, em resultado do rápido de fermentação de hidratos de carbono no rúmen e a acumulação de ácido láctico (GALYEAN;OWENS, 1988).

A utilização de lasalocida, monensina e salinomicina como promotores de crescimento foram extinto na União Europeia em 2006. Em outras regiões, os ionóforos são utilizados para melhorar a eficiência da produção através da alteração da microbiota gastrointestinal de animais (REEVES, 2012).

2.2 Fármacos no ambiente

A maior parte da literatura desde a metade da década de 90 tem se concentrado em estudos de ocorrência no ambiente. Dietze et al. (2005) e Lalumera et al.(2004) detectaram a presença de antibióticos em sistemas aquaculturais; Hirsh et al. (1999)e Löffler e Ternes (2003),águas superficiais; Benbz et al. (2005) e Karthikeyan e Mayer (2006), águas residuárias; Kim e Carlson (2007), sedimentos.

Os estudos sobre o transporte de sulfonamidas em água de escoamento (KAY et al., 2005) eacirculação de sulfonamidas através do solo (BLACKWELL et al., 2007) indicam que estas substâncias não possuem alto grau de desorção.

Yang et al. (2004) observaram grande influência da agricultura, devido a utilização de adubos orgânicos, sobre a ocorrência de sulfonamidas como sulfametazina, sulfadimetoxina e sulfametoxazol no rio Poudre (norte do Colorado, EUA), através da adubação orgânica . Além disso, Alder et al. (2001) relataram que a concentração de sulfametazina em um lago perto de pecuária intensiva foi maior

do que nos efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais na mesma área. Além disso, Kolpin et al. (2002) examinaram as concentrações de fármacos em 139 córregos em todos os 30 estados nos EUA entre 1999 e 2000. Neste estudo, sulfametoxazol, sulfametazina, trimetoprim, clorotetraciclina e oxytetracyclines foram detectados numa faixa de 0,002-0,42 µg / L.

Existem poucos relatos na literatura descrevendoas concentrações ambientais, destino e transporte de monensina. Comparado com tetraciclinas e macrólidos, monensina não é fortemente adsorvido no solo e tem sido detectada em água de rio e sedimentos aquáticos no Colorado (KIM; CARLSON, 2006) e em pequenos corpos d'água do sul de Ontário (LISSEMORE et al., 2006).

Literatura relacionada às quinolonas no ambiente como resultado de uso veterinário é escassa. Vestígios de ácido oxolínicoflumequina e sarafloxacina foram detectados em sedimentos em pisciculturas (SAMUELSEN et al., 1992) e vestígios de enrofloxacina no solo foram detectados em um estudo demonitoramento no Reino Unido (GIGUERE, 2006b).

Estes e outros estudos demonstram o transporte destes compostos para águas superficiais e subterrâneas e outras matrizes ambientais a partir de fontes urbanas e agrícolas.

Para avaliação de riscos ambientais é necessário conhecer as diferentes fontes de emissões de fármacos no ambiente. Assim como os demais fármacos, os antibióticos podem se distribuir no ambiente por diversas rotas sejam elas urbanas ou agrícolas. A principal origem de fármacos no ambiente está nas ETEs, pois se eles não forem eliminados pelo processo de purificação, os mesmos passam pelo sistema de esgoto e atingem o ambiente aquático. Por outro lado, muitos compostos excretados não são rapidamente degradados nas ETEs, embora possam ser parcialmente degradados por processos físico-químicos e biológicos (TERNES;JOSS, 2006).

Práticas de uso de adubo orgânico como complemento e fertilizante agrícola tem facilitado a entrada de antibióticos, administrados ao gado, no ambiente, pois mais de 75 % destes compostos são eliminados pelos animais (HALLING-SØRENSEN, 2001). Assim como dejetos quando drenados e estocados em lagoas

de decantação, usada comumente para irrigação também podem conter antibióticos e seus metabólitos. Estimando-se que 12 milhões de toneladas de dejetos sejam produzidas anualmente no Brasil, apenas considerando o rebanho bovino, a entrada de antibióticos veterinários por esta rota pode ser relevante. Muito embora, para Sarmah et al. (2006) a importância do caminho individual destes compostos no ambiente varie e dependa da quantidade de resíduo, práticas de aplicação de adubo orgânico no solo e os tipos e as doses de antibióticos usados.

Em rios, lagos e córregos foram detectados resíduos de antibióticos, cujos valores revelam diferentes ordens de magnitude, pois as concentrações frequentemente decaem quando a distância da fonte aumenta. Sedlack et al. (2004) consideram que a diminuição de resíduos de antibióticos em águas naturais ocorre por diferentes mecanismos (fotólise, atividade microbiana, sorção e aspectos hidrológicos entre outros) que operam simultaneamente. Outro ponto importante no decaimento das concentrações dos resíduos de antibióticos nos rios é a diluição provocada pela vazão do rio.

2.3 Degradação

Segundo Gartiser et al. (2007) grande parte dos antibióticos testados ate agora não são biodegradáveis. Contudo, a enrofloxacina foi degradada, em testes de laboratório, por fungo branco de madeira, os quais podem estar presentes no solo, mas não em lodo de esgoto (WETZSTEIN, 1999).Antibióticos com ocorrência em solos e sedimentos provaram ser inteiramente persistentes em estudos laboratoriais e de campo, não sendo biodegradáveis em condições anaeróbicas (ALEXY;KÜMMERER, 2006).

2.4 Toxicidade

Tamanho da população e idade da primeira reprodução tem grande importância ecológica (ROFF, 2001). Enquanto muitas variáveis da história de vida podem ser obtidas usando as técnicas demográficas, as mais comuns são a média da longevidade, taxas líquida de reprodução (R0) e taxas de crescimento

populacional (r) (KREBS, 1985). Grist et al. (2003) relataram que, embora a maioria das variáveis do ciclo de vida ésignificativamente influenciada pelas substâncias tóxicas, r é particularmente mais sensível ao estresse. Qualquer substância química que afeta a aptidão de um organismo (sobrevivência, desenvolvimento, fecundidade ou diferenciação sexual) é susceptível de ter efeitos que transcendem a resposta individual e pode afetar todo o ecossistema (KASHIAN;DODSON 2004).

Compostos ativos são formulados para atingirem caminhos metabólicos e moleculares específicos em humanos e animais, porém frequentemente podem apresentar efeitos colaterais, como é o exemplo damonensina que é um antibiótico ionóforo, usado como coccidiostáticos para várias espécies animais, e para promoção de crescimento e prevenção de timpanismo em bovinos (BARROS, 1998). Embora considerados seguros quando usados para a espécie-alvo, dentro das doses recomendadas pelo fabricante, o uso dessas drogas tem sido responsável por intoxicação em bovinos (GAVA et al., 1997), equinos (BEZERRA et al., 1999), ovinos (RIET-CORREA et al., 1999), suínos (ARMIÉN et al., 1997), coelhos (SALLES et al.,1994), cães (WILSON, 1980), galinhas (CHALMERS, 1981) e outras aves (GREGORY et al., 1992).

Os antimicrobianos quando introduzidos no ambiente podem percorrer os mesmos caminhos em organismos não alvos, gerando efeitos não esperados. Os efeitos e diferentes modos de ação ecotoxicológica de antibióticos (sinais fisiológicos e comportamentais que caracterizam uma resposta biológica adversa) tanto de uso humano como veterinário, são ainda pouco conhecidos considerando os diferentes níveis da hierarquia biológica. Enquanto a toxicidade de antibióticos contra bactérias patogênicas é bem conhecida, poucos dados sobre a ecotoxicidade provocada pela exposição prolongada a baixas concentrações de antibióticos a organismos não alvo estão disponíveis (MIGLIORE et al., 1997).

Muito embora os ensaios de toxicidade aguda constituam-se em importante ferramenta de monitoramento e de análise de risco ambiental, parece não ser a estratégia mais adequada para avaliação de efeitos adversos provocados por antibióticos sobre organismos não-alvo. Frequentemente a toxicidade aguda está relacionada a modos de ação não específicos e não a mecanismos que envolvam alvos específicos (CAMINADA et al., 2006). Estudos sobre a toxicidade aguda de antibióticos veterinários (ISIDORI et al., 2005)detectaram efeitos apenas a partir de

concentrações de 100 a 1000 vezes maiores do que a de resíduos detectados no ambiente aquático (ηg/L e µg/L).

2.5 Organismo teste

Crustáceos são os principais constituintes dos ecossistemas aquáticos que oferecem uma variedade de serviços ecológicos e econômicos, sendo adeptos a ocupar diversos nichos (LEBLANC, 2007).

Os cladóceros têm sido amplamente utilizados como organismos de bioensaios para avaliar o impacto de diferentes substâncias tóxicas. A literatura durante os últimos 10 anos revelou que a pesquisa ecotoxicológica com cladócero está em uma fase exponencial constituindo cerca de 10% das publicações neste grupo. As substâncias tóxicas mais comuns utilizadas nos ensaios de toxicidade com cladóceros são os metais pesados, pesticidas e algumas toxinas naturais tais como cianotoxinas (SARMA; NANDINI, 2006).

Algumas das características que tornam os cladóceros adequado para testes de ecotoxicidade aquática incluem (KOIVISTO, 1995): (i) tamanho pequeno, (ii) sensibilidade a uma vasta quantidade de substâncias tóxicas, (iii) grande distribuição, (iv) reprodução predominantemente partenogenética, (v) disponibilidade de técnicas de cultura, (vi) ninhadas degrande tamanho, (vii) alta densidade populacional e (viii) rápidas taxas de crescimento populacional.

Mais que 80% dos trabalhos publicados são concentrados em gêneros planctônicos como *Daphnias, Ceriodaphnia e Moina*. Logo como existe uma grande quantidade de informações disponíveis sobre a *D. magna* existe uma facilidade na comparação de resultados entre trabalhos diferentes mas que usaram esse mesmo organismos teste (DUMONT, 1997).Devido a todos esses fatores a *D. magna* (Figura 4) foi escolhida para ser o organismo teste dessa pesquisa.

Figura 4 - Organismo Teste: *Daphnia magna*

2.6 Ecotoxicologia

Segundo Zagatto (2006) o interesse do homem pelas questões ambientais tem aumentado gradativamente nestas últimas décadas, devido, principalmente, às ocorrências de acidentes com produtos químicos, com repercussão mundial. O mesmo autor ainda afirma que o alto nível de industrialização, a necessidade do aumento de produção aliada à alta densidade populacional, distribuídas principalmente em áreas geográficas próximas aos baixos rios e regiões litorâneas e a intensa atividade agrícola tem aumentado significativamente os lançamentos de despejos e resíduos nos cursos d'água.

Tendo em vista a complexidade causada pela interação dos agentes químicos, os efeitos biológicos desses efluentes não podem ser caracterizados simplesmente por análises tradicionais. Assim, para a caracterização adequada e controle desses efluentes, a estratégia mais eficiente é o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas para a avaliação e previsão do risco ambiental (CONSTAN et al., 1993).

O uso dos testes ecotoxicológicos integra os conceitos da Ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da Toxicidade, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (PLAA, 1982).

Embora os primeiros testes de toxicidade com despejos industriais tenham sido realizados entre 1863 e 1917, somente na década de 1930 foram implementados alguns testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos (RAND, 1995).

Segundo Rand (1980) os ensaios de toxicidade podem ser utilizados para diversos fins, como, por exemplo, para: determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólios, dentre outros; estabelecer critérios e padrões de qualidade de água; estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos; avaliar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental; avaliar a qualidade das águas; avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; subsidiar programas de monitoramento ambiental; estimar os impactos provocados em acidentes ambientais.

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo. Estes ensaios procuram estimar a concentração da substância-teste que causa efeito a 50% da população exposta, durante um tempo determinado, variando de 24 a 96 horas.

No ambiente aquático, em geral, os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes. Essa exposição pode não levar a morte do organismo, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo. Esses efeitos não são detectados em ensaios de toxicidade aguda, sendo necessário o uso de ensaios de toxicidade crônica, o qual permite avaliar os efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

O ensaio de toxicidade crônica tem como objetivo definir dentre as concentrações utilizadas, aquela em que não são detectados efeitos de importância biológica sobre as variáveis de interesse (sobrevivência, reprodução, crescimento, etc.) (CAPIZZI et al., 1985).

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo visa determinar a ação isolada e de misturas binárias dos medicamentos veterinários (Monensina, Sulfametazina e Enrofloxacina) em *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea).

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a toxicidade aguda (CE_{50}) individual e das misturas binárias dos fármacos monensina, sulfametazina e enrofloxacina em *Daphnia magna*;
2. Determinar a toxicidade crônica (CENO e CEO) individual e das misturas binárias dos fármacos monensina, sulfametazina e enrofloxacina em *Daphnia magna*;
3. Determinar a ação sinérgica, aditiva ou antagônica dos ensaios de misturas em relação aos ensaios isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material teste

Todas as substâncias padrões utilizadas foram compradas da empresa Sigma-Aldrich, sendo elas a Monensin Sodium Salt referência M5273-1G com 90-95% de pureza, Sulfamethazine referência S6256-25G com pureza de ≥ 99% e a Enrofloxacin referência 17849-5G-F apresentando uma pureza de ≥ 98%.

4.2 Cultivo das *D. magna*

As culturas de *D. magna* foram mantidas em béquers de vidro transparente com volume de 2 litros (Figura 5), sendo que em cada recipiente foi colocado 1,8 litros do meio de cultivo, contendo 40 organismos testes. O cultivo foi mantido em incubadora com temperatura de 20± 1^{0}C e com um fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (Figura 6). O meio de cultivo utilizado foi o meio M4 (Tabela 1)(OECD, 2004), sendo o mesmo trocado duas vezes por semana (Segundas e Sextas).Os seguintes parâmetros físico-químicos foram controlados: condutividade de 300 ± 25 µScm^{-1}, dureza total de 220 ± 25 mgL^{-1} $CaCO_3$ e pH de 7 a 8.

O meio M4 era preparado utilizando as seguintes quantidades de soluções estoque (s.e.) para cada litro de água reconstituída: 4 mL da s.e.1; 1 mL da s.e. 2; 1 mL da s.e.3; 1 mL da s.e. 4; 0,1mL da s.e. 5; 0,5 mL da s.e. 6; 0,2 mL da s.e. 7; 4 mL da s.e. 8; 0,5 mL da s.e. 9 e 0,1 mL da s.e. 10.

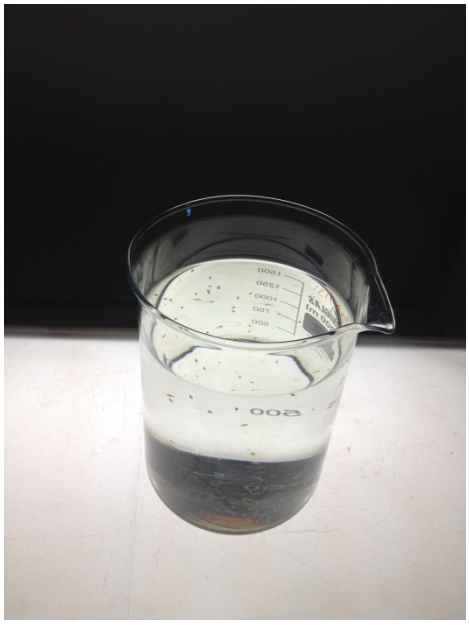

Figura 5 - Cultivo dos organismos teste *D. magna*

Figura 6 - Incubadora utilizada no cultivo das *D. magna*

A alimentação das culturas aconteceu diariamente, na aquantidade de alga de 10^6 células/dia/organismo. A alga utilizada para alimentação foi a *Pseudokirchneriella subcaptata* (Figura 7), sendo a mesma cultivada em meio LC oligo (Tabela 2) (ABNT, 2003), quando necessário o pH foi ajustado entre 6,0 e 8,0 com solução de NaOH ou HCl a 2N. Para cada litro de meio Lc Oligo produzido foi

utilizado 1 mL das soluções estoques 1, 2, 3, 4 e 7 e 0,5 mL das soluções estoques 5 e 6.

Tabela 1 - Preparo das soluções estoque para obtenção da água de diluição (meio M4)

Solução Estoque	Reagente	Fórmula molecular	Quantidade ($g.L^{-1}$)
1	Cloreto de cálcio di-hidratado	$CaCl_2.2H_2O$	68,5
2	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$MgSO_4.7H_2O$	114,95
3	Cloreto de potássio	KCl	0,58
4	Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	64,8
5	Cloreto de manganês tetra-hidratado	$MnCl_2.4H_2O$	3,605
	Cloreto de lítio	$LiCl$	3,06
	Cloreto de rubídio	$RbCl$	0,71
	Cloreto de estrôncio hexa-hidratado	$SrCl_2.6H_2O$	1,52
	Cloreto de cobre di-hidratado	$CuCl_2.2H_2O$	0,1675
	Cloreto de zinco	$ZnCl_2$	0,13
	Cloreto de cobalto hexa-hidratado	$CoCl_2.6H_2O$	0,1
6	Ácido bórico	H_3BO_3	5,719
	Brometo de sódio	$NaBr$	0,032
	Molibidato de sódio di-hidratado	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,126
	Iodeto de potássio	KI	0,0065
	Selenito de sódio penta-hidratado	$Na_2SeO_3.5H_2O$	0,0044
	Monovanadato de amônia	NH_4VO_3	0,00115
	Nitrato de sódio	$NaNO_3$	0,0548
7	Meta silicato de sódio	$NaSiO_3.9H_2O$	5
8 *	Sulfato de ferro hepta-hidratado	$FeSO_4.7H_2O$	0,2489
	EDTA dissódicodi-hidratado	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$	0,625
9	Fosfato de potássio tetra-hidratado	$KH_2PO_4.4H_2O$	0,0286
	Fosfato de potássio di-hidrogenado	K_2HPO_4	0,0368
10	Hidrocloreto de tiamina	$C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$	0,750
	Cianocobalamina (B_{12})	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	0,01
	Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,0075

* As soluções de $FeSO_4.7H_2O$ e $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ foram preparadas individualmente em dois litros de água purificada por osmose reversa. As duas soluções foram misturadas e autoclavadas a 121°C por um período de 15 minutos.

Tabela 2 - Preparo das soluções estoque para obtenção do meio LC oligo

Solução Estoque	Reagente	Fórmula molecular	Quantidade
1	Nitrato de Cálcio Tetra-Hidratado	$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	40 g
	Água deionizada		1000 mL
2	Nitrato de Potássio	KNO_3	100 g
	Água deionizada		1000 mL
3	Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado	$MgSO_4 . 7H_2O$	30 g
	Água deionizada		1000 mL
4	Fosfato Monoácido de Potássio	K_2HPO_4	40 g
	Água deionizada		1000 mL
	Sulfato de Cobre(I) Penta-hidratado	$CuSO_4 . 5H_2O$	30 mg
	Molibdato de Amônio	$(NH_4)_6 . MO_7O_{24} .4H_2O$	60 mg
5	Sulfato de Zinco Hepta-hidratado	$ZnSO_4 . 7H_2O$	60 mg
	Cloreto de Cobalto Hexa-hidratado	$CoCl_2 . 6H_2O$	60 mg
	Nitrato de Manganês Tetra-hitratado	$Mn(NO_3)_2 . 4 H_2O$	60 mg
6	Ácido Cítrico Mono-hidratado	$C_6H_8O_7 . H_2O$	60 mg
	Ácido bórico	H_3BO_3	60 mg
	Água deionizada		1000 mL
	Citrato de Ferro Penta-hidratado	$C_6H_5FeO_7 .5H_2O$	1,625 g
	Sulfato de Ferro Hepta-hidratado	$FeSO_4 . 7H_2O$	0,625 g
	Cloreto de Ferro Hexa-hidratado	$FeCl_3 . 6H_2O$	0,625 g
	Água deionizada		1000 mL
7	Bicarbonato de sódio	$NaHCO_3$	15 g
	Água deionizada		1000 mL

Figura 7 - Cultivo da alga *Pseudokirchneriella subcaptata* para alimentação dos cultivos de *D. manga*

4.3 Ensaios toxicológicos

Todos os ensaios realizados foram mantidos em incubadora com temperatura controlada em 20 ± 1^{0}C e fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro. As diluições dos fármacos foram feitas em meio M4 e colocadas no aparelho de ultrasson marca Brason modelo 2510 com tempo de permanência máxima de 3 minutos para auxiliar na dissolução dos mesmos.

4.3.1 Ensaio de toxicidade Aguda

Estes ensaios foram conduzidos com cinco concentrações mais o controle, cada uma com três réplicas (n=3) com sete organismos em cada réplica, seguindo as normativas da OECD (2004) e ABNT (2003). Foram realizadas duas leituras 24/48 horas, nas quais se contabilizou o número de indivíduos imóveis e/ou mortos.

O cálculo do EC_{50} 48h, que é a concentração que causa mortandade em 50% da população de organismos testados, e o intervalo de confiança com 95% de

confiança foram determinados a partir da regressão linear dos resultados utilizando o método Trimmed Spearman-Karber versão 1.5 (HAMILTON et al., 1977).

Segundo Freitas (2011), a toxicidade aguda de uma substância em relação aos organismos aquáticos pode ser classificada segundo a Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação da toxicidade aguda de substâncias em relação a organismos aquáticos

Organismos Aquáticos	
CL_{50}/CE_{50} (mgL^{-1})	Classificação
X ≥ 100	Pouco Tóxico
10 ≤ x ≥ 100	Mediamente Tóxico
1 ≤ x ≥ 10	Muito Tóxico
0 ≤ x ≥ 1	Altamente Tóxico

Após a determinação da EC_{50} 48h esses valores foram transformados em unidade tóxica (UT) (SPRAGUE; RAMSAY, 1965; BLAISE; FÉRARD, 2005) para fins de comparação com os resultados dos ensaios de mistura. Para transformar o EC_{50} 48h em UT foi utilizada a seguinte equação:

$$UT = 100/((EC_{5048h}*100)/A) \quad \textbf{(1)}$$

onde EC_{50} 48h é o resultado do ensaio agudo individual e A é a maior concentração utilizada no ensaio.

Para determinação do efeito sinérgico, aditivo ou antagônico foi utilizado à seguinte comparação:

sinérgico – $UT_{(M)} > UT_{(Subst.\ 1)} + UT_{(Subst.\ 2)}$

aditivo - $UT_{(M)} = UT_{(Subst.\ 1)} + UT_{(Subst.\ 2)}$

antagônico - $UT_{(M)} < UT_{(Subst.\ 1)} + UT_{(Subst.\ 2)}$

O desenho experimental para análise dos efeitos da mistura de antibióticos veterinários foi baseado no conceito de UT. A solução estoque da mistura foi feita a

partir de duas partes de volume iguais, cada uma apresentando o dobro da maior concentração utilizada nos ensaios agudos isolados de cada substância testada. Os ensaios tiveram as seguintes concentrações: 100%, 75%, 50%, 25% e 10% mais o controle, cada uma com três réplicas (n=3), com sete organismos em cada réplica (OECD, 2004; ABNT, 2003).

Foram realizadas duas leituras 24/48 horas, nas quais se observou o número de indivíduos imóveis e/ou mortos. Para transformar o $EC_{50(M)}$ em UT foi utilizada a seguinte equação:

$$UT_M = 100/EC_{50(M)} \qquad \textbf{(2)}$$

4.3.2 Ensaio de toxicidade Crônica

Estes ensaios seguiram as normativas da OECD (2012), constando-se de cinco concentrações mais o controle, cada concentração com 10 réplicas (n=10), contendo um organismo em cada réplica. O teste teve a duração de 21 dias, tendo sido o meio teste trocado três vezes por semana e a alimentação administrada diariamente a quantidade de 10^6 células $mL^{-1}dia^{-1}$. As concentrações desse experimento foram baseadas no CE_{50} dos testes agudos 48h realizadas previamente, utilizando-se de um fator de diluição 3 que foi igual para todos os ensaios realizados.

Foram avaliados três “endpoints” durante esses ensaios: sobrevivência, reprodução e tamanho do adulto. A sobrevivência e a produção da prole foram avaliadas durante cada renovação do meio de cultivo, sendo os organismos neonatos contados e descartados. A influência no desenvolvimento individual foi verificada no ultimo dia do experimento onde os organismos foram fotografados com ajuda de uma lupa com câmera fotográfica acoplada. A medição dos organismos foi feita através das fotos utilizando o programa ImageJ versão 1.46r.

A partir dos dados obtidos utilizou-se o teste estatístico ANOVA para avaliar se os resultados apresentavam significância. Em seguida foi realizado o teste de Dunnett´s (DUNNETT, 1964) que comparou as médias do controle com a dos

tratamentos testados. Determinando assim os parâmetros CENO (Concentração de efeito não observado) e CEO (Concentração de efeito observado).

Para fins de comparação do efeito dos ensaios crônicos isolados e dos ensaios crônicos de misturas o CEO foi transformado em UT, para essa conversão foram utilizadas as equações previamente citadas.

Na montagem dos ensaios crônicos de misturas a solução estoque foi feita a partir de duas partes de volume igual, sendo uma parte apresentando o dobro da maior concentração de um dos ensaios crônicos isolado e a outra parte apresentando o dobro da concentração do outro ensaio crônico isolado. Logo gerando uma mistura apresentando as maiores concentrações dos ensaios crônicos isolados.

As concentrações desse experimento foram baseadas no CEO dos testes crônicos realizados previamente, utilizando-se de um fator de diluição três que foi igual para todos os ensaios realizados. Os testes foram realizados com as seguintes percentuais de utilização da solução estoque: 100%, 33%, 11.11%, 3.7%, 1.23% e 0.41% mais o controle, cada uma com 10 réplicas (n=10), com um organismo em cada réplica. Cada ensaio teve a duração de 21 dias, tendo sido o meio teste trocado três vezes por semana e a alimentação administrada diariamente a uma quantidade de 10^6 células $mL^{-1}dia^{-1}$ (OECD, 2012).

Foram avaliados três “endpoints”: sobrevivência, reprodução e o tamanho do adulto. A sobrevivência e a reprodução foram avaliadas durante cada renovação do meio de cultivo, sendo os organismos neonatos contados e descartados. A medição dos organismos adultos, realizada no último dia do experimento, foi aferida através de fotos feitas com uma lupa com câmera fotográfica acoplada e tendo a medição dos organismos feita através do programa ImageJ versão 1.46r, para verificar se houve ou não influência no desenvolvimento individual.

O teste de Dunnett´s (DUNNETT, 1964) foi utilizado tanto nas medidas de tamanho individual dos organismos como na quantidade de filhotes gerados durante todo o ensaio para determinar se as concentrações testadas apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

Com fins de comparação o $CEO_{(M)}$ dos ensaios crônicos de mistura também foi convertido em UT, utilizando-se da equação 2 previamente citada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 são apresentados os resultados dos ensaios agudos individuais. A monensina apresentou o maior efeito tóxico entre os três fármacos testados, seguida da enrofloxacina e por fim a sulfametazina. O resultado da toxicidade da enrofloxacina ao microcrustáceo corresponde aos achados por Bayer (1997) que reportou o CE_{50} de *D. magna* de ser maior que 10 mgL^{-1} em exposição de 24h e de Park e Choi (2008) que determinou o CE_{50} 48h de 56,7 mgL^{-1}. O CE_{50} 48h da sulfametazina determinado nesse estudo, também esta de acordo com Jung et al. (2008), que encontrou o CE_{50} 48h de 185,3 mgL^{-1} para a mesma substância. Já o CE_{50} 48h da monensina encontrado foi duas vezes maior do que o encontrado por EFSA (2005) que encontrou o CE_{50} 48h de 7,29 mgL^{-1}.

Tabela 4 - Toxicidade aguda dos antimicrobianos testados individualmente para *D. magna*

Antibióticos		CE_{50} (mgL^{-1})	
	Intervalo testado (mgL^{-1})	24h	48h
Monensina	1 - 40	-	15,11 (13,82-16,51)
Enrofloxacina	10 - 100	-	54,36 (46,12-64,02)
Sulfametazina	130 - 250	-	183,80 (174,71-193,36)

Segundo a classificação de toxicidade apresentada anteriormente, na tabela 3, a monensina e a enrofloxacina entrariam na classificação de substâncias mediamente tóxicas, já a sulfametazina estaria na classificação de pouco tóxica.

A unidade tóxica (UT) para os ensaios individuais foram calculadas utilizando a equação 1, previamente citada e obtive-se os seguintes resultados: monensina – 2,64 UT; enrofloxacina – 1,62 UT; sulfametazina – 1,63 UT.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados dos ensaios agudos de mistura, onde o ensaio monensina/enrofloxacina apresentou maior toxicidade, seguido do ensaio sulfametazina/enrofloxacina e por último o ensaio monensina/sulfametazina apresentou a menor toxicidade.

Tabela 5 - Toxicidade aguda dos antimicrobianos testados em misturas para *D. magna*

Antibióticos	Intervalo testado (%)	CE_{50} (%) 24h	48h
Monensina/Enrofloxacina	10 - 100	37,69(35.04-40.55)	19,15(16,49-22,24)
Sulfametazina/Enrofloxacina	10 - 100	-	44,74(39,73-50,38)
Monensina/Sulfametazina	10 - 100	-	45,05(39,77-51,03)

A unidade tóxica (UT) para os ensaios de mistura foram calculadas utilizando a equação 2 e obteve-se os seguintes resultados:monensina/enrofloxacina – 5,22 UT; sulfametazina/enrofloxacina – 2,23 UT; monensina/sulfametazina – 2,21 UT.

Seguindo a comparação das Unidades tóxicas o ensaio monensina/enrofloxacina caracterizou-se pela ação sinérgica, isto é, a mistura dos dois antimicrobianos proporcionou um aumento da toxicidade (5,22 UT > 2,64 UT + 1,62 UT), apresentando a maior toxicidade para a *D. magna*. A transformação da porcentagem da CE_{50} 48h da mistura para a unidade mgL^{-1} obteve-se as concentrações de 7,66 mgL^{-1} para a monensina e 19,15 mgL^{-1} para a enrofloxacina.

Seguindo a classificação da Tabela 3 percebe-se que a classificação da enrofloxacina não foi alterada em relação ao ensaio isolado apesar do aumento de 2,8 vezes de sua toxicidade, contudo a classificação da monensina que apresentou um aumento de quase 2,0 vezes de sua toxicidade passou de mediamente tóxicas para muito tóxica.

O ensaio sulfametazina/enrofloxacina apresentou ação antagônica (2,23 UT < 1,63 UT + 1,62 UT), mostrando um decaimento na toxicidade em relação aos ensaios individuais para o organismo teste utilizado. Fazendo a transformação da porcentagem da CE_{50} 48h da mistura para a unidade mgL^{-1} obteve-se as concentrações de 44,77 mgL^{-1} para a enrofloxacina e 111,85 mgL^{-1} para a sulfametazina. Não apresentando nenhuma alteração em suas classificações em relação aos ensaios isolados.

O ensaio monensina/sulfametazina também apresentou ação antagônica (2,21UT < 2,64 UT + 1,63 UT). A transformação da porcentagem da CE_{50} 48h da mistura para a unidade mgL^{-1} obteve-se as concentrações de 18,02 mgL^{-1} para a monensina e 112,625 mgL^{-1} para a sulfametazina. Também não apresentando nenhuma alteração em suas classificações em relação aos ensaios isolados.

A sulfametazina estava presente nos dois ensaios de mistura que apresentaram ação antagônica, levantando a possibilidade de que ela seja a causa da diminuição da toxicidade dos ensaios de mistura.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados dos ensaios crônicos isolados, o resultado se mostrou semelhante aos ensaios agudos individuais com a monensina apresentando a maior ação tóxica seguida da enrofloxacina e por fim a sulfametazina.

Em relação à reprodução, a monensina e a enrofloxacina apresentaram um comportamento dose-dependente. A sulfametazina também apresentou um comportamento dose-dependente, contudo a concentração mais baixa testada (0,75 mgL^{-1}) apresentou um incremento de reprodução dos indivíduos estatisticamente maior em relação ao controle, o que poderia explicar a diminuição da toxicidade dos ensaios agudos de mistura na qual a sulfametazina estava presente.

Tabela 6 - Toxicidade crônica dos antimicrobianos testados individualmente com *D. magna*

Antibióticos	Intervalo testado (mgL^{-1})	CENO (mgL^{-1})	CEO (mgL^{-1})
Monensina	0,01 – 0,81	0,03	0,09
Enrofloxacina	0,11 – 9,0	0,11	0,33
Sulfametazina	0,75 – 61,26	2,26	6,8

Em relação ao “endpoint” sobrevivência nenhuma das três substâncias testadas apresentou diferença estatística em relação ao controle.

A Figura 8 apresenta a comparação do tamanho dos organismos adultos em relação ao controle dos ensaios crônicos individuais. Percebe-se que para o ensaio em que se utilizou a sulfametazina os tamanhos das *D. magna* não sofreram variação estatisticamente significativa em relação ao controle, contudo os ensaios

com monensina e da enrofloxacina apresentaram diferença estatística no tamanho dos organismos em algumas das concentrações testadas em relação ao controle.

No ensaio utilizando a monensina as concentrações que apresentaram maior diferença estatística em relação ao tamanho das *D. magna*, em ordem crescente, foram: 0,01; 0,27; 0,09 e 0,03 mgL^{-1}. A maior concentração testada 0,81 mgL^{-1} não apresentou diferença estatística em relação ao controle, o que nos leva a concluir que a resposta para o "endpoint" tamanho das *D. magna* em relação a monensina não é dose-dependente.

O mesmo aconteceu com o ensaio utilizando a enrofloxacina, sendo que as concentrações que apresentaram maior diferença estatística, em ordem crescente, foram: 9,0; 0,11; 0,33 mgL^{-1}. As concentrações 1,0 e 3,0 mgL^{-1} não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, o que também nos leva a inferir que a resposta do tamanho das *D. magna* em relação a enrofloxacina não é dose-dependente.

O estudo de Daughton e Ternes (1999) e Kolpin et al. (2002) detectaram antibióticos de uso veterinário em águas superficiais em baixas concentrações ($ηgL^{-1}$/$μgL^{-1}$) em vários compartimentos dos ecossistemas aquáticos e terrestres, sendo assim a enrofloxacina e a monensina que apresentaram toxicidade do CEO na faixa de 330 $μgL^{-1}$e 90 $μgL^{-1}$ respectivamente, seriam capazesde causar um impacto negativo no ecossistema. Contundo a sulfametazina apresentou sua toxicidade na faixa de 6,8 mgL^{-1} o que esta muito acima das concentrações encontradas no ambiente.

Para fins de comparação o CEO dos ensaios crônicos individuais foi convertido para UT utilizando a equação 1, de onde se obteve: monensina – 9 UT, enrofloxacina – 27,27 UT e a sulfametazina – 9 UT.

NaTabela 6 são apresentados os resultados dos ensaios crônicos de mistura dos antimicrobianos.O ensaio monensina/enrofloxacina apresentou maior toxicidade, seguido do ensaio monensina/sulfametazina e por fim sulfametazina/enrofloxacina.

Em relação ao "endpoint" sobrevivência nenhuma das três misturas testadas apresentou diferença estatística em relação ao controle.

Os resultados da comparação do tamanho dos organismos adultos em relação ao controle dos ensaios crônicos de misturas são apresentados na Figura 9. O ensaio sulfametazina/enrofloxacina não apresentou diferença estatística em

relação ao controle, contudo apresentou uma grande variabilidade nas amostras principalmente nos percentuais de 3,7 e 100%.

O ensaio monensina/sulfametazina apresentou duas concentrações com tamanhos dos adultos maiores que o controle (0,41 e 100%), apresentou três concentrações que não diferiram do controle (1,23, 11,11 e 33%) e apenas uma concentração com tamanhos menores que o controle (3,7%).

O teste monensina/enrofloxacina apresentou uma concentração (100%) com tamanho maior em relação ao controle e todas as outras concentrações não apresentaram diferença quando comparadas com o controle.

Esses dados nos permite inferir que a resposta do tamanho das *D. magna* para as misturas testadas, não possui uma resposta dose-dependente.

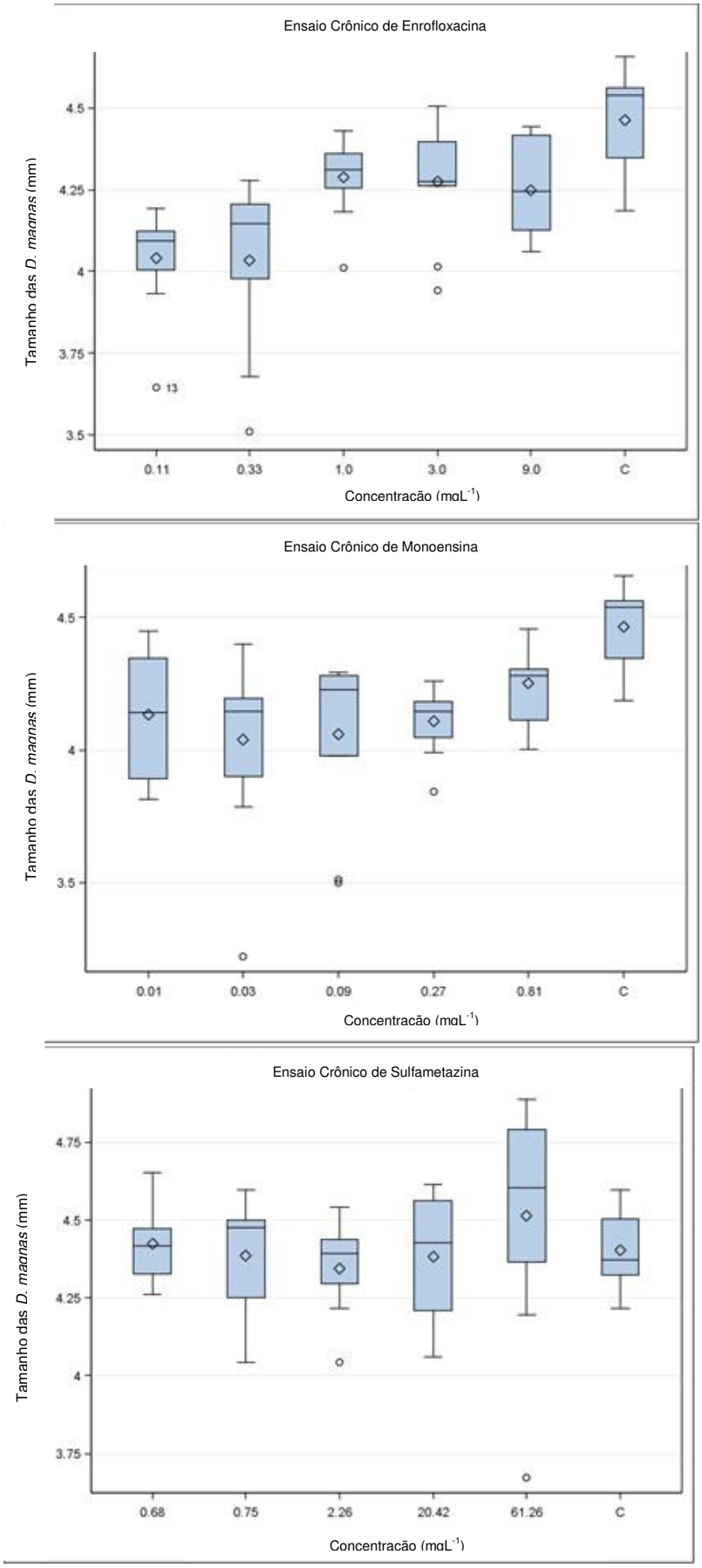

Figura 8 - Resultados das variações dos tamanhos das *D. magna* dos ensaios crônicos isolados.

Tabela 7 - Toxicidade crônica para os antimicrobianos testados em misturas com *D. magna*

Antibióticos	Intervalo testado (%)	CENO (%)	CEO (%)
Monensina/Enrofloxacina	0,41 - 100	-	0,41
Sulfametazina/Enrofloxacina	0,41 - 100	33	100
Monensina/Sulfametazina	0,41 - 100	1,23	3,7

A unidade toxica (UT) para os ensaios crônicos de mistura foram calculadas utilizando a equação 2, obtendo os seguintes resultados:

monensina/enrofloxacina – 243,9 UT;
sulfametazina/enrofloxacina – 1 UT;
monensina/sulfametazina – 27 UT.

Com base nesses dados é possível dizer que o ensaio monensina/enrofloxacina caracterizou-se pela ação sinérgica (243,9 UT >9 UT + 27,27 UT), apresentando a maior toxicidade para a *D. magna*. O ensaio monensina/sulfametazina também apresentou ação sinérgica (27UT > 9 UT + 9 UT), mostrando um aumento da toxicidade em relação ao ensaio individual da sulfametazina. O ensaio sulfametazina/enrofloxacina apresentou ação antagônica (1UT < 9 UT + 27,27 UT).

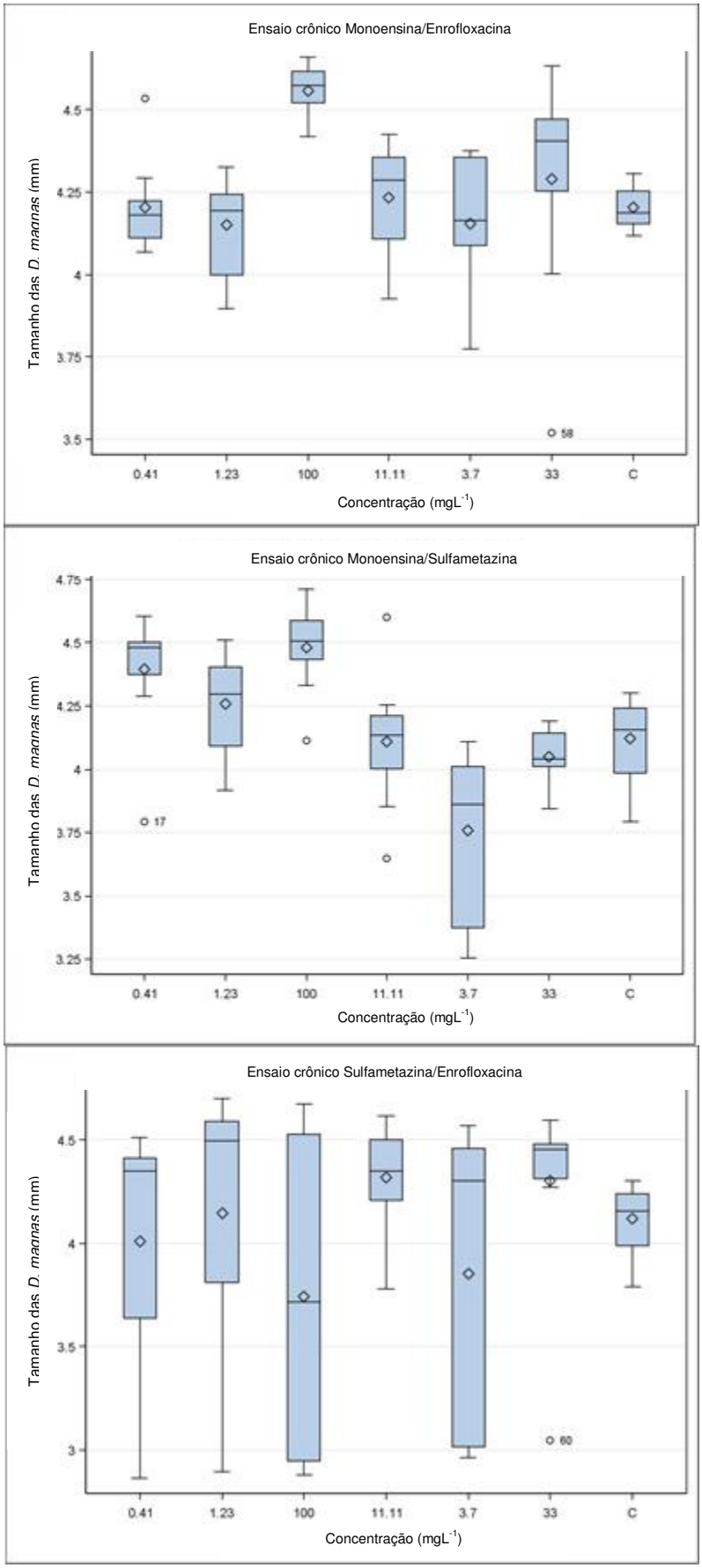

Figura 9 - Resultados das variações dos tamanhos das *D. magna* dos ensaios crônicos de mistura de antimicrobianos.

Porter e Orcutt (1977) relataram que a taxa líquida de reprodução (R0) de *D. magna* é normalmente 59-83 neonatos, no entanto no presente estudo, os três antibióticos monensina, sulfametazina e enrofloxacina apresentaram o R0 inferiores nas concentrações mais elevadas do ensaio, tanto nos ensaios crônicos individuais quanto no ensaios crônicos de mistura (Figura10).

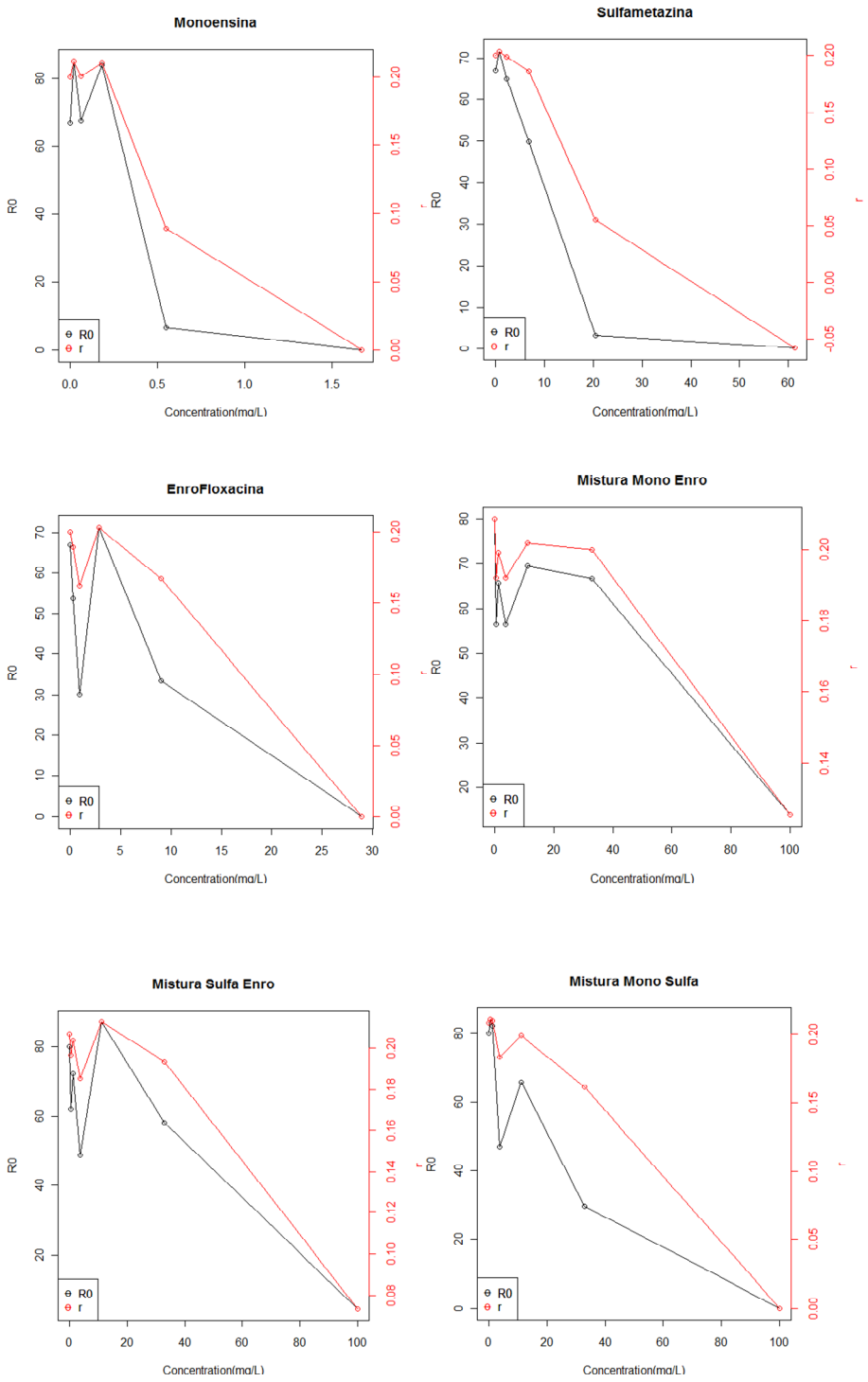

Figura 10 - Taxa líquida de reprodução (R0) e taxa de crescimento populacional (r) de *D. magna* após 21 dias de exposição aos antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados de toxicidade aguda e crônicos dos antibióticos avaliados isoladamente assim como os de misturas nos permitem concluir que a *Daphnia magna* se mostrou sensível a monensina, a enrofloxacina e a sulfametazina. Dentre esses três antimicrobianos testados nesse trabalho a monensina se apresentou como a mais tóxica.

Os ensaios agudos de mistura mostrou que a interação desses medicamentos pode interferir em suas toxicidades, causando efeitos de ação sinérgica e efeitos de ação antagônica. Os ensaios de mistura da enrofloxacina/sulfametazina e monensina/sulfametazina apresentaram ação antagônica, já o ensaio monensina/enrofloxacina apresentou ação sinérgica.

O mesmo aconteceu com os ensaios crônicos, onde as misturas binárias monensina/enrofloxacina e o ensaio monensina/sulfametazina apresentaram um aumento na toxicidade em relação aos compostos testados isoladamente, causada pela ação sinérgica das misturas. O ensaio enrofloxacina/sulfametazina apresentou uma diminuição da toxicidade aos organismos testes, devido à ação antagônica.

Os ensaios crônicos, onde os compostos foram testados isoladamente apresentam um comportamento dose-dependente em relação à reprodução para os três antimicrobianos. Contudo quando comparados com os resultados dos ensaios crônicos de mistura se evidencia que a interação desses medicamentos provocou uma alteração na toxicidade individual dos antimicrobianos testados, causando uma resposta não dose-dependente em relação à reprodução.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É necessária a realização de mais trabalhos com misturas de medicamentos, não só com outras moléculas como também com outros organismos testes, para entendermos o real impacto que essas moléculas causam ao ambiente natural.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia*spp (Cladocera, Crustacea).Rio de Janeiro, 2003.

AJIT, K.; SARMAH,A.; MICHAEL, T.; MEYER,B.; ALISTAIR, B.A.; BOXALL,C.A global perspective on the use,sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**,Oxford, v. 65, p. 725–759, 2006.

ALCOCK, R.E.;SWEETMAN, A.;JONES, K.C. Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants. I. Selected compounds and physiochemical properties. **Chemosphere**,Oxford, v. 38, p. 2247–2262, 1999.

ALDER, C.A.;MCARDELL, C.S.;GOLET, E.M.;IBRIC, S.;MOLNAR, E.;NIPALES, N.S.;GIGER, W.Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during waste water treatment and in ambient water in Switzerland. In: DOUGHTON, C.G.; JONES-LEPP,I. (Ed.).**Pharmaceuticals and personal care products in the environment**: scientific and regulatory issues. Washington, DC: ACS, 2001. p. 56–69. (Symposium Series, 791).

ALEXY, R., KÜMMERER. K. Antibiotics for human use. In: REEMTSMA, T.; JEKEL, M. (Ed.). **Organic pollutants in the water cycle**.Weinheim: Willey VCH, 2006. p. 65-86.

ANADÓN, A. ;MARTINEZ-LARRANAGA, M.R.; DIAZ, M.J.; BRINGA, S.P.; MARTINEZ, M.A.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; FERNANDEZ, M.C.; FERNANDEZ, R. Pharmacokineticsandresiduesofenrofloxacininchickens.**American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, p.501–506, 1995.

ANIMAL HEALTH INDUSTRY - IFAH. **A global market**.Brussels, Belgium, 2011. Disponível em: http://www.ifahsec.org/ Acesso: 10 maio 2011.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 478 p.

ARMIÉN, A.G.;PEIXOTO, P.V.;DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H. Surto de intoxicação por narasina em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 17, p. 63-68, 1997.

BARROS, C.S.L. Intoxicação por antibióticos ionóforos. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C. (Ed.).**Doenças de ruminantes e equinos**. Pelotas: Editora Universitária, UFPel, 1998. p. 462-466.

BAYER.**Baytril**. 10% injection: safety datasheet 345354/01. Newbury, UK, 1997.

BENDZ, D.;PAXÉUS, N.A.;GINN, T.R.;LOGE, F.J. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: HöjeRiver in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**,Amsterdam, v. 122,p. 195-204, 2005.

BERGER, K.;PETERSON, B.;BUENING-PFAUNE, H.Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. **ArchivfürLebensmittelhygiene**, Hannover, Germany, v. 37, p. 99–102, 1986.

BERGEN, W.G.;BATES, D.B.Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action.**Journal of Animal Science**, Albany, v. 58, p. 1465–1483, 1984.

BEZERRA, P.S.;DRIEMEIER, D.;LORETTI, A.P.;RIET-CORREA, F.;KAMPHUES, J.;BARROS, C.S.L. Monensin poisoning in Brazilian horses. **Veterinary and HumanToxicology**,Manhattan, v. 41, p. 383-385, 1999.

BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**.São Paulo: Melhoramentos, 1980. 1062 p.

BLACKWELL, P.A.;KAY, P.;BOXALL, A.B.A.The dissipation andtransport of veterinary antibiotics in a sandy loam soil.**Chemosphere**,Oxford, v.67, p. 292–299, 2007.

BLAISE, C.; FÉRARD, J.F. Effluent assessment with the PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) Index. In: BLAISE, C.; FÉRARD, J.F. (Ed.). **Small-scale freshwater toxicity investigations**. Dordrecht: Springer Publishers, 2005. v. 2, p. 69-87.

CAMINADA, D.;ESCHER, C.;FENT, K. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish celllines. **AquaticToxicology**, Amsterdam, v. 79, p. 114-123, 2006.

CAPANEMA, L.X.C.; VELASCO, L.O.M.; SOUZA, J.O.B.; NOGUTI, M.B. Panorama das indústrias farmacêuticas veterinárias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 25,p. 157-174, 2007.

CAPIZZI, T.; OPPENHELMER, L.; MEHTA, H.; NAIMIE, H. Statistical considerations in the evaluation of chronic aquatic toxicity studies. **Environmental Science and Technology**, Washington, 19: 35-43. 1985.

CHALMERS, G.A. Monensin toxicity in broiler chickens. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 22, p. 21-22, 1981.

COLLIER, A.C. Pharmaceutical contaminants in potable water: Potential concerns for pregnant women and children. **EcoHealth**, New York, v. 4, p. 164-171, 2007.

CONSTAN, G.; BERMINGHAM, N.; BLAISE, G.; FERARD, J.F. Pontencial ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to accesses and compare the toxic potencial of industrial effluents. Environmental Toxicology and Water Quality, New York, 8: 115-140. 1993.

DUNNETT, C.W. New tables for multiple comparisons with a control".**Biometrics**, Washington, DC, v.20, p.482–491, 1964.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107:p. 907-938, 1999.

DIETRICH, D.R.; WEBB, S.F.; PETRY, T. Hot spots pollutants: pharmaceuticals in the environment. **ToxicologyLetters**, Amsterdam, v. 131, p. 1–3, 2002.

DIETZE, J.E.; SCRIBNER, E.A.; MEYER, M.T.; KOLPIN, D.W. Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001-2003.**International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v.85, n. 15, p. 1141-1152, 2005.

DUMONT, H.J. Cladoceran studies: where do we go from here? **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 360, p. 301-303, 1997.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances usedin Animal Feed on a request from the European Commission on the evaluationof the coccidiostat COXIDIN® (Monensin Sodium). **EFSA Journal**, Parma, v.283, p.1-53, 2005.(Question EFSA-Q-2005-024).

FENT, K. Effects of pharmaceuticals on aquatic organism.In:KÜMMERER, K.(Ed.). **Pharmaceuticals in the environment**: sources, fate, effects and risks. 3. ed. Heidelberg: Springer, 2008. p. 175-203.

Freitas, M.R.R. de. **Avaliação ambiental e a atuaçãodo IBAMA no registro deagrotóxicos**. Brasília: IBAMA, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Insumos_agropecuarios/52RO/App_Ibama.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2013.

GALYEAN, M.L.;OWENS, F.N. Effects of monensin on growth,reproduction, and lactation in ruminants.In:ISI ATLAS OFSCIENCE: Animal and Plant Sciences. Philadelphia:ISI Press, 1988. p. 71–75.

GAVA, A.;WOUTERS, A.T.B.;WOUTERS, F.;NIZGOSKI, L.;BARROS, C.S.L.Intoxicaçãoporsalinomicinaembovinos.**PesquisaVeterináriaBrasileira**,Seropédica, v. 17, p.127-130, 1997.

GIGUERE, S. Antimicrobial drug action and interaction: An introduction.In: GIGUERE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M.(Ed.).**Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 4. ed. Ames: Blackwell, 2006a. p. 3–9.

GIGUERE, S.Lincosamides, pleuromutilins, and strep- togramins.In: GIGUERE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, JD.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M.(Ed.).**Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. 4. ed. Ames: Blackwell, 2006b. p. 179–190.

GREGORY,D.G.;EDWARDS, W.C.;STAIR, E.L.A case of monensin poisoning in ostriches.**Veterinary and Human Toxicology**,New York, v. 34, p. 247, 1992.

GRIST, E.P.M.;CRANE, M.;JONES, C.;WHITEHOUSE, P. Estimation of demographic toxicity through the double bootstrap.**Water Research**,New York, v. 37, p.618–626, 2003.

HALLING-SØRENSEN, B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents.**Archives of Environmental, Contamination and Toxicology,**New York, v. 40, p. 451–460, 2001.

HALLING-SØRENSEN, B.;NIELSEN, S.N.;LANZKY, P.F. INGERSLEV, F. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment:a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HAMILTON, M.A.;RUSSO, R.C.;THURSTON, R.V.TrimmedSpearman-Karber method for estimating median lethal concentrationsin toxicity bioassays.**Environmental Science & Technology,**Washington, DC, v. 11, p. 714–719, 1977.

HIRSCH, R.;TERNES, T.;HABERER, K.;KRATZ, L.K. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.**The Science of the Total Environment**,Amsterdam, v. 225, p. 109-118,1999.

ISIDORI, M.;LAVORGNA, M.;NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.;PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms.**The Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 346, p. 87-98, 2005.

JARDIM, G.M.; ARMAS, E.D.;MONTEIRO, R.T.R..Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbataí River, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Biology***,* São Carlos,2008, v.68, n.1, p. 51-59, 2011.

JENSEN, J., 2001. Veterinary medicines and soil quality: the Danish situation as an example. In: DAUGHTON, C.G.; JONES-LEPP, T. (Ed.).**Pharmaceuticals and personal care products in the environment:** scientific and regulatory issues. Washington, DC:ACS, 2001.p. 282–302.

JUNG, J.;KIM, Y.;KIM, J.; JEONG, D.;CHOI, K. Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in Daphnia magna.**Ecotoxicology**, London, v. 17, p. 37-45, 2008.

KARTHIKEYAN, K.G.;MEYER, M.T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA.**The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 361,p. 196-207, 2006.

KASHIAN, D.R.; DODSON, S.I. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in Daphnia magna**.Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 23, p.1282–1288, 2004.

KAY, P.;BLACKWELL, P.A.;BOXALL, A.B.A. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land.**Chemosphere**, Oxford, v.59, p. 951–959, 2005.

KOIVISTO, S. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? **Environmental Pollution,** Amsterdam,v. 90, p. 263–267, 1995.

KOLPIN, D.W.;FURLONG, E.T.;MEYER, M.T.;THURMAN, E.M.;ZAUGG, S.D.;BARBER, L.B.;BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones,and other organic wastewater contaminants in US streams 1999–2000:a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**,Washington, DC, v.36, p.1202–1211, 2002.

KIM, S.;CARLSON, K. Occurrence of ionophore antibiotics inwater and sediments of a mixed-landscape watershed.**Water Research**, New York, v. 40, p. 2549–2560, 2006.

KIM, S.C.;CARLSON, K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices.**Environmental Science & Technology**, Washington, DC,v. 41, p. 50-57, 2007.

KOLPIN, D.W.;FURLONG, E.T.;MEYER, M.T.;THURMAN, E.M.;ZAUGG, S.D.;BARBER, L.B.;BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones and other waste water contaminants in US streams 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC,v. 36, p.1202–1211. 2002.

KREBS, C.J.**Ecology**: the experimental analysis of distribution and abundance. New York: Harper & Row, 1985.

KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment**: sources, fate, effects and risks. 3. ed. Heidelberg: Springer, 2008. 521 p.

LALUMERA, G.M.;CALAMARI, D.;GALLI, P.;CASTIGLIONE, S.;CROSA, G.;FANELLI, R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. **Chemosphere**, Oxford, v. 54, p. 661-668, 2004.

LEBLANC, G.A. **Crustacean endocrine toxicology**: a review. Philadelphia:Springer Science & Business Media, 2007.

LEES, P.;TOUTAIN, P.-L.**Chemical analysis of antibiotic residues in food**. Hoboken: John Wiley, 2012.

LISSEMORE, L.;HAO, C.;YANG, P.;SIBLEY, P.K.;MABURY, S.;SOLOMON, K.R.; An exposure assessment for selected pharmaceuticalswithin a watershed in Southern Ontario, **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 717–729, 2006.

LÖFFLER, D.;TERNES, T.A. Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometric.**Journal of Chromatography A**,Amsterdam, v. 1021,p. 133-144, 2003.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.;DOJMI, D.G. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*.**Water Research**, Oxford, v.31, p. 1801-1806, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT.**Guidelines for testing of chemicals**:*Daphnia* sp., acute immobilization test.Paris: OECD, 2004. 12p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT.**Guidelines for testing of chemicals**: *Daphnia magna*reproduction test. Paris: OECD, 2012. 25p.

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibioticson aquatic ecosystems.**Ecotoxicology,** London, v. 17, p. 526–538, 2008.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, 60:1010-1016, 1982.

PORTER, K.G.;ORCUTT JUNIOR, J.D. Nutritional adequacy, manageability, and toxicity as factors that determine the food quality of green and blue–green algae for Daphnia. In: KERFOOT, W.C. (Ed.).**Evolution and ecology of zooplankton communities**.Hanover, NH: University Press of New England, 1977. p. 268–281.

RAND, G.M. In: GUTHRIE, F.E.; PERRY, J.J. **Introduction to environmental toxicology**. Amsterdam: Elsevier, 1980.

RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate and risk assessment. London: Taylor & Francis, 1995. 1125 p.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic ecotoxicology. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology**:effects, environmental fate and risk assessment.London: Taylor & Francis, 1995.p. 3-67.

REEVES, P.T. **Chemical analysis of antibiotic residues in food**.Hoboken: John Wiley, 2012.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira.**Revista Brasileira de Ciênciado Solo**, Viçosa,v. 34, n. 3, p. 601-616, 2010.

REIS FILHO, R.W.;BARREIRO, J.C.;VIEIRA, E.M.;CASS, Q.B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 2, p. 54-61, 2007.

RENNER, R. Do cattlegrowthhormones pose anenvironmentalrisk? **Environmental Science &Technology**, Washington, DC, v.36, p.194A-197A, 2002.

RIET-CORREA, G.; Barros, C.S.L.;ILHA, M.R.S.; STIGGER, A.L. Intoxicação por antibiótico ionóforo em ovinos. In:JORNADA ACADÊMICA DE PESQUISA, 14.,1999, Santa Maria.**Anais…** Santa Maria: UFSM, 1999.p. 712.

ROFF, D.A. Age and size at maturity. In: FOX, C.W.;ROFF, D.A.;FAIRBAIRN, D.J. (Ed.).**Evolutionary ecology**:concepts and case studies. New York: Oxford University Press, 2001. p. 99-127.

RUSSELL, J.B.A proposed mechanism of monensin action ininhibiting ruminal bacterial growth:effects on ion fluxandprotonmotive force.**Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p.1519-1525, 1987.

SALLES, M.W.S.;BARROS, C.S.L.;BARROS, S.S. Ionophore antibiotic (narasin) poisoning in rabbits.**Veterinary and Human Toxicology**, New York, v.36, p.437-444, 1994.

SAMUELSEN, O.B.;LUNESTAD, B.T.;HUSEVAG, B.;HØLLELANDT, E.A. Residues of oxolinic acid in wild fauna followingmedication in fish farms.**Diseases ofAquaticOrganisms**,Oldendorf, v. 12, p. 111-119, 1992.

SARMA, S.S.S.;NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans.**Journal of Environmental Science and Healt. Part B**: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, New York, v. 41, p. 1417-1430, 2006.

SARMAH,A.K.;MEYER, M.T.;BOXALL, A.B.A.A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence,fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment.**Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 725-759, 2006.

SEDLACK, D.L.;HUANG, C.H.;PINKSTON, K. Strategies for selecting pharmaceuticals to assesses attenuation during indirect potable water reuse. In: KÜMMERER, K. (Ed.). **Pharmaceuticals in the environment**: sources, fate, effects and risks. 3. ed. Heidelberg: Springer, 2008. p. 107-120.

SEGURA, O.A.;FRAÇOIS, M.;GAGNON, C.;SAUVÉ, S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters.**Environmental Health Perspectives**,Durham, NC, v. 117, n. 5, p. 675-684,2009.

SPRAGUE, J.B.; RAMSAY, B.A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon.**Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 22, p. 425-432, 1965.

SILVA, E.;RAJAPAKSE, N.;KORTENKAMP, A. Something from “nothing”: eight weak estrogenic chemicals combinated at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 36, p. 1751-1756, 2002.

TERNES, T. A.;JOSS, A. **Human pharmaceuticals, hormones and fragnances**: the challenge of micropollutants in urban water management. London: IWA Publishing, 2006.

WILSON, J.S. Toxic myopathy in a dog associated with the presence of monensin in dry food. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.21, p. 30-31, 1980.

WETZSTEIN, H.-G.; STADLER, M.; TICHY, H.-V.; DALHOFF, A.; KARL, W. Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 1556-1563, 1999.

WILSON, C.J.; BRAIN, R.A.; SANDERSON, H.; JOHNSON, D.J.; BESTARI, K.T.; SIBLEY, P.K.; SOLOMON, K.R. Structural and functional responses of plankton to a mixture of four tetracyclines in aquatic microsystems. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 38, p. 6430-6439, 2004.

WISE, R. Antimicrobial resistance: priorities for action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 585-886, 2002.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture.**Science**, Washington, DC, v. 279, p. 996–997, 1998.

YANG, S.; CHA, J.; CARLSON, K. Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** Chichester, v. 18, p. 2131-2145, 2004.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática:** princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 478 p.