

# BIOINDICADORES NEOTROPICAIS DE ECOTOXICIDADE E RISCO AMBIENTAL DE FÁRMACOS DE INTERESSE PARA AQUICULTURA

Taise FLORÊNCIO<sup>1</sup>; Silva Patrícia CARRASCHI<sup>2</sup>; Claudinei da CRUZ<sup>3</sup>; Adilson Ferreira da SILVA<sup>1</sup>; Aline Marcari MARQUES<sup>2</sup>; Robinson Antonio PITELLI<sup>1</sup>

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar a toxicidade aguda (CL/CE50) e o risco ambiental do toltrazuril (TOL) e do florfenicol (FFC) para a planta aquática *Lemna minor*, o caramujo *Pomacea canaliculata*, os peixes *Piaractus mesopotamicus* e *Hyphessobrycon eques* e o microcrustáceo *Daphnia magna*. Os organismos foram aclimatados em salas de bioensaio de acordo com as normas vigentes para cada organismo. Estes foram expostos às concentrações nominais em sistema estático. Para a avaliação do risco ambiental (RQ) foi utilizada a concentração ambiental estimada (CAE), concentração indicada para tratamento e a concentração letal ou efetiva (CL/CE50) de cada fármaco em exposição aguda. O FFC apresentou CL50;7d de 97,03 mg L<sup>-1</sup> para *L. minor*; >100,0 mg L<sup>-1</sup> para *P. mesopotamicus* e *H. eques* e CE50;48h > 100,0 mg L<sup>-1</sup> para *P. canaliculata* e para *D. magna*, e causa baixo risco (RQ = 0,01) para os bioindicadores. O TOL apresentou CL50;7d >100,0 mg L<sup>-1</sup> para *L. minor*, 3,72 mg L<sup>-1</sup> para *P. mesopotamicus*; 6,22 mg L<sup>-1</sup> para o *H. eques* e CE50;48h de 7,59 mg L<sup>-1</sup> para *P. canaliculata* e 18,57 mg L<sup>-1</sup> para *D. magna*, e causa baixo risco (RQ = 0,01) para *L. minor* e alto risco para *P. mesopotamicus* (RQ = 2,68); para *H. eques* (RQ = 6,22), para *P. canaliculata* (RQ = 1,31) e para *D. magna* (RQ = 0,53). *Lemna minor* é o melhor bioindicador da toxicidade do FFC e *H. eques*, bioindicador do TOL. O FFC é seguro para uso na aquicultura, porém o TOL causa risco para os bioindicadores.

**Palavras-chave:** toxicidade; drogas; segurança ambiental; organismos não alvos

## NEOTROPICAL BIOINDICATORS OF ECOTOXICITY AND ENVIRONMENTAL RISK OF DRUGS WITH AQUACULTURE INTEREST

### ABSTRACT

The aims of this research were to evaluate the acute toxicity (LC/EC50) and the environmental risk of toltrazuril (TOL) and florfenicol (FFC) for plant *Lemna minor*, snail *Pomacea canaliculata*, fish *Piaractus mesopotamicus* and *Hyphessobrycon eques* and the microcrustacean *Daphnia magna*. The organisms were acclimated in room bioassay with controlled temperature according to standard to each one. They were exposed at nominal concentrations in static system. For environmental risk (RQ) was used the estimated environmental concentration (EEC) that is the dosage indicate to treatment and the lethal or effective concentration (LC/CE50) from each drug in acute exposure. FFC showed LC50;7d of 97.03 mg L<sup>-1</sup> for *L. minor*; >100.0 mg L<sup>-1</sup> for *P. mesopotamicus* and *H. eques* and EC50;48h > 100.0 mg L<sup>-1</sup> for *P. canaliculata* and *D. magna*, and it was classified low risk (RQ = 0.01) for all bioindicators. TOL showed LC50;7d >100.0 mg L<sup>-1</sup> for *L. minor*, 3.72 mg L<sup>-1</sup> for *P. mesopotamicus*; 6.22 mg L<sup>-1</sup> for *H. eques* and CE50;48h of 7.59 mg L<sup>-1</sup> for *P. canaliculata* and 18.57 mg L<sup>-1</sup> for *D. magna*, and it was classified low risk (RQ = 0.01) for *L. minor* and high risk for *P. mesopotamicus* (RQ = 2.68), *H. eques* (RQ = 6.22), *P. canaliculata* (RQ = 1.31) and *D. magna* (RQ = 0.53). *Lemna minor* was the bioindicator indicating of FFC toxicity and *H. eques*, bioindicator of the TOL. FFC is safety however and the use of TOL necessaries cautions to treat the wastewater before discard on the environment.

**Keywords:** toxicity; drugs; environmental safety; non-target organisms

**Artigo Científico:** Recebido em 18/02/2014 – Aprovado em 16/08/2014

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista, Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM). e-mail: taise\_florencio@hotmail.com; adilsonf.s@hotmail.com; rapitelli@ecosafe.agr.br

<sup>2</sup> Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e NEPEAM/UNESP. Via Ac. Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/nº – Zona Rural – CEP: 14884-900 – Jaboticabal – SP – Brasil. e-mail: patycarraschi@gmail.com (autor correspondente); alinemarcar@hotmail.com

<sup>3</sup> Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos (LEEA), Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – SP – Brasil. e-mail: cruzcl@yahoo.com

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a intensificação dos sistemas aquícolas tem favorecido a ocorrência de patógenos durante o ciclo produtivo. A expansão desta atividade tem gerado alguns problemas, ainda não mensurados para os ambientes aquáticos, como o uso não regulamentado de produtos químicos das mais diversas classes, no controle dos surtos de doenças.

Para o uso seguro dos fármacos é obrigatório seu registro e, para tanto, é necessária uma sistemática avaliação ecotoxicológica, ambiental e alimentar. Para compor a base desta avaliação, nos ensaios de toxicidade, são utilizados organismos representantes dos diversos níveis da cadeia alimentar, caracterizados como bioindicadores. Estes devem ser sensíveis, de fácil manejo, ter ampla disponibilidade, cosmopolitas e de tamanho suficiente para amostragem de tecidos (BURGER *et al.*, 2013). Assim, os estudos de toxicidade aguda e risco ambiental são uma ferramenta fácil de ser empregada e geram resultados sobre os possíveis efeitos ecotoxicológicos dos xenobióticos em organismos não alvos nos ambientes aquícolas.

Os peixes são expostos de forma direta aos xenobióticos e, por isso, são bioindicadores potenciais de toxicidade (HELFRICH *et al.*, 1996). As espécies obrigatórias em normas são o *Brachydanio rerio* e o *Pimephales promelas*, porém são espécies exóticas (ABNT, 2011). O mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) e o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) são peixes neotropicais e suas sensibilidades foram determinadas em condição de bioensaio por CRUZ *et al.* (2008), sendo consideradas espécies que preenchem os requisitos para serem utilizadas como bioindicadores.

Os microcrustáceos, como *Daphnia magna*, também são obrigatórios e sua utilização baseia-se em que seus descendentes são geneticamente idênticos, assegurando uniformidade nas respostas (SOUZA *et al.*, 2011). A macrófita aquática *Lemna minor* é uma angiosperma e se reproduz vegetativamente com novas frondes (folhas) brotadas a partir das bordas de folhas mais velhas. Essa espécie também é obrigatória e representa os vegetais aquáticos superiores (OECD, 2002; SOUZA *et al.*, 2011).

O caramujo de água doce *Pomacea canaliculata* não é indicado em norma de ensaio ecotoxicológico, porém é um bom bioindicador, sensível aos xenobióticos (VENTURINI *et al.*, 2008). Como consumidor primário e em contato direto com o sedimento, está exposto aos xenobióticos, principalmente aos que se adsorvem ao sedimento, podendo ser revolvidos e novamente biodisponibilizados (DUFT *et al.*, 2003).

No Brasil, o processo de registro de fármacos para uso na aquicultura está em fase inicial. Dentre eles, o florfenicol (FFC) é um antibiótico eficaz contra bactérias gram-negativas, como *Aeromonas salmonicida* e *A. hydrophila*, para vários peixes de criação (NORDMO *et al.*, 2006) e tem registro no Brasil para uso em truta (*Onchorynchus mykiss*) e tilápia (*Oreochromus niloticus*) (MSD, 2009). O toltrazuril (TOL) é um parasiticida utilizado no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, microsporídeo, mixozoa, *Tricodina* spp. e monogenéticos (SCHMAHL e MEHLHORN, 1988; ATHANASSOPOULOU *et al.*, 2004).

Após a obtenção dos dados ecotoxicológicos, para um produto químico ser empregado diretamente na aquicultura ou em outra atividade de interesse ambiental, outra ferramenta importante é a avaliação do risco (RQ), que utiliza a razão entre a concentração ambiental estimada (CAE), que é a dose do fármaco utilizada no tratamento e a CL 50 (GOKTEPE *et al.*, 2004).

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a toxicidade aguda (CL50) e efetiva (CE50) do TOL e do FFC para a macrófita *L. minor*, o caramujo, *P. canaliculata*, os peixes *H. eques* e *P. mesopotamicus* e o microcrustáceo *D. magna* e determinar o risco ambiental dos fármacos para os organismos teste.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal (SP), exceto os ensaios com *D. magna*, realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional (Laborseg), da mesma unidade.

Os produtos comerciais utilizados foram o Aquaflor® (500,0 g FFC kg<sup>-1</sup>), MSD® Animal Health e o Baycox® (2,5 g TOL 100,0 mL<sup>-1</sup>), Bayer® HealthCare. Os valores de CL50 e/ou CE50 dos fármacos foram calculados pelo software Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977).

#### Ensaio de toxicidade para a *Lemna minor*

As macrófitas *L. minor*, oriundas do setor de criação do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Unesp de Jaboticabal (SP), foram aclimatadas em sala de bioensaio, em temperatura 25,0 ± 2,0 °C e fotoperíodo 12 horas de luz, durante quatro dias e monitoradas, sem mortalidade. Antes da utilização, as plantas foram desinfetadas em solução de hipoclorito a 2% e água destilada (OECD, 2002). Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade das plantas com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) com CL50;7d de 6,67 g L<sup>-1</sup> e intervalo de confiança de 95% entre 5,48 e 6,85 g L<sup>-1</sup>.

Para os ensaios, foram selecionadas quatro colônias com três frondes, totalizando 12 frondes por réplica, e colocadas em recipiente com 50 mL de Hoagland's (LI e XIONG, 2004) por 24 horas. Após esse período, foi adicionado mais 50 mL de meio de cultivo com os fármacos FFC e TOL e mantidas em exposição por sete dias, em recipientes de volume de 100 mL.

As soluções estoque dos fármacos foram preparadas em água destilada, adicionadas ao recipiente de ensaio contendo as plantas e foram mantidos em sistema estático, sem aeração e cobertos com plástico filme.

Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares das drogas para definir o intervalo de concentração que causa zero e 100% de mortalidade, utilizando como concentração limite: 100 mg L<sup>-1</sup> (OECD, 2009).

As concentrações de FFC e TOL utilizadas nos ensaios definitivos foram 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e um controle, em três réplicas. A avaliação da mortalidade das frondes foi realizada por meio de observação de frondes cloróticas, ausência de clorofila, e necróticas, em decomposição, realizada no 3º, 5º e 7º dia após a exposição.

#### Ensaio de toxicidade para *Pomacea canaliculata*

Os caramujos, com peso médio de 1,14 ± 0,14 g, oriundos do setor de criação do NEPEAM, foram aclimatados por sete dias em sala de bioensaio à temperatura de 25,0 ± 2,0 °C, fotoperíodo de 12 horas, em caixas de 60 L, com aeração contínua, alimentação diária com planta *Hydrilla verticillata* (VENTURINI *et al.*, 2008) e foram monitorados, sem ocorrência de imobilidade. Inicialmente, foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de potássio (KCl) com CE50;48h de 1,49 g L<sup>-1</sup> (1,14-1,96 g L<sup>-1</sup>).

As soluções estoque das drogas foram preparadas e adicionadas após 24 horas de aclimação dos organismos nos aquários, em sistema estático, e os organismos foram mantidos sem alimentação durante o período experimental.

Ensaio preliminares foram realizados para determinar o intervalo de concentração que causa zero e 100% de imobilidade utilizando a concentração limite de 100 mg L<sup>-1</sup> (OECD, 2009).

Nos ensaios definitivos dos fármacos, cinco caramujos foram selecionados e distribuídos em cada réplica, em aquários de três litros, sendo expostos a 60,0; 70,0; 80,0; 90,0; 100,0 mg FFC L<sup>-1</sup> e 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0; 16,0 e 19,0 mg TOL L<sup>-1</sup> e um controle, com três réplicas. A avaliação da imobilidade foi realizada em 24 e 48 horas após a administração dos fármacos.

#### Ensaio de toxicidade para o *Hyphessobrycon eques* e *Piaractus mesopotamicus*

Os peixes *H. eques* e *P. mesopotamicus*, oriundos do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e de pisciculturas da região, com peso médio de 0,79 ± 0,06 g e 1,03 ± 0,24 g, para mato grosso e pacu, respectivamente, foram aclimatados em sala de bioensaio à 25,0 ± 2,0 °C, em tanques de 400 L, com aeração contínua, fotoperíodo de 12 horas, por dez dias (ABNT, 2011) e monitorados, sem ocorrência de mortalidade. Primeiramente foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de potássio (KCl) com CL50;48h do KCl de 2,20 g L<sup>-1</sup> (1,84-2,67 g L<sup>-1</sup>) para o *H. eques* e 1,54 g L<sup>-1</sup> (1,24-1,86 g L<sup>-1</sup>), para o *P. mesopotamicus*.

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, com três organismos por réplica, três réplicas por concentração, sem alimentação, duração de 48 horas, em aquários com capacidade de quatro litros.

Ensaio preliminares foram realizados para determinar o intervalo de concentração que causa zero e 100% de imobilidade utilizando a concentração limite de 100 mg L<sup>-1</sup> (OECD, 2009).

Para os ensaios definitivos, as concentrações de FFC para as duas espécies foram 60,0; 70,0; 80,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e de TOL para *H. eques*, 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> e para *P. mesopotamicus*, 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>. A mortalidade, por meio da observação de ausência de batimento opercular e espasmos, foi avaliada em 24 e 48 horas após a exposição aos fármacos.

#### Ensaio de toxicidade para *Daphnia magna*

Os microcrustáceos foram cultivados em meio de cultivo composto de água destilada reconstituída com nutrientes e mantidos em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 20,0 °C. A alimentação foi constituída de cultura composta de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus*, na concentração aproximada de 5x10<sup>6</sup> células indivíduo<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, e solução contendo ração fermentada para peixes ornamentais e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (ABNT, 2009).

Os neonatos, apresentando idade entre seis e 24 horas de vida, foram selecionados e distribuídos cinco em cada réplica. Nos ensaios de sensibilidade, a CL50;48h da substância referência cloreto de sódio (NaCl) foi 4,31 g L<sup>-1</sup> (3,97- 4,69 g L<sup>-1</sup>). Para *D. magna* não há aclimação dos organismos nos recipientes, portanto é adicionada a solução estoque relativa a cada concentração, o meio e os neonatos no mesmo momento. Nos ensaios definitivos foram utilizadas as concentrações: 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 mg FFC L<sup>-1</sup> e 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 mg TOL L<sup>-1</sup> e um controle.

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, com quatro réplicas por concentração e a imobilidade foi avaliada após 48 horas de exposição aos fármacos, por meio de ausência de movimento em dez segundos de observação.

#### Risco ambiental e Classificação Ecotoxicológica

O risco ambiental (RQ) foi calculado por meio da razão entre a concentração ambiental estimada

(CAE), que é a dose do fármaco utilizada no tratamento, e a concentração letal CL 50 (GOKTEPE *et al.*, 2004), sendo as classes de risco: RQ > 0,5 = Alto risco; 0,05 < RQ < 0,5 = Médio risco e RQ < 0,05 = Baixo risco.

A CAE utilizada do FFC foi 10 mg kg<sup>-1</sup> (CARRASCHI *et al.*, 2011a) e do TOL, 50,0 mg L<sup>-1</sup> (MEHLHORN *et al.*, 1988).

Para a classificação ecotoxicológica foi utilizada a escala de ZUCKER (1985), que segue: CL50 < 0,1 mg L<sup>-1</sup> extremamente tóxico; 0,1 < CL50 < 1,0 mg L<sup>-1</sup>, altamente tóxico; 1,0 < CL50 < 10,0 mg L<sup>-1</sup>, moderadamente tóxico; 10 < CL50 < 100 mg L<sup>-1</sup>, pouco tóxico e CL50 > 100 mg L<sup>-1</sup>, praticamente não tóxico.

## RESULTADOS

Para *L. minor*, a CL50;7d do FFC foi 97,03 mg L<sup>-1</sup> (com limite inferior (LI) de 86,44 e superior (LS) de 108,93 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 1) e a CL50;7d do TOL foi maior que 100 mg L<sup>-1</sup>, pois não ocorreu no mínimo 50% de mortalidade das frondes nas concentrações testadas (Tabela 2). O FFC e o TOL causaram baixo e médio risco para a *L. minor*, 0,10 e 0,01, respectivamente (Tabela 3).

Para *P. canaliculata*, a CE50;48h do FFC foi maior que 100,0 mg L<sup>-1</sup>, pois não ocorreu no mínimo 50% de imobilidade (Tabela 1). A CE50;48h do TOL foi 7,59 mg L<sup>-1</sup> (LI de 6,24 e LS 9,23 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 2). O FFC e o TOL causaram médio risco para o caramujo, 0,10 e 0,13, respectivamente (Tabela 3).

Para *H. eques* e *P. mesopotamicus*, a CL50;48h do FFC foi maior que 100,0 mg L<sup>-1</sup>, pois não ocorreu mortalidade (Tabela 1). A CL50;48h do TOL, para *H. eques*, foi 6,22 mg L<sup>-1</sup> (5,41 e 7,16 mg L<sup>-1</sup>), e para *P. mesopotamicus*, 3,72 mg L<sup>-1</sup> (3,45-4,02 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 2). O FFC e o TOL causaram médio risco para *P. mesopotamicus* e *H. eques*, 0,10, 0,10, 0,27 e 0,16, respectivamente (Tabela 3).

Para *D. magna*, a CE50;48h do FFC foi maior que 100 mg L<sup>-1</sup>, pois não ocorreu imobilidade utilizando concentrações de até 100 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1). A CE50;48h do TOL foi 18,57 mg L<sup>-1</sup> (16,08-21,45 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 2). O FFC e o TOL causaram médio risco para a *D. magna*, 0,10 e 0,05, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 1.** Porcentagem de mortalidade (%) dos organismos testes durante os ensaios com o Florfenicol.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	<i>Lemna minor</i>	<i>Pomacea canaliculata</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	<i>Daphnia magna</i>
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10,0	-	-	-	-	0,0
25,0	-	-	-	-	0,0
50,0	-	-	-	-	0,0
60,0	34,0	0,0	0,0	0,0	-
70,0	43,0	0,0	0,0	0,0	-
75,0	-	-	-	-	0,0
80,0	44,0	13,3	0,0	0,0	-
90,0	45,0	6,7	0,0	0,0	-
100,0	52,0	6,7	0,0	0,0	0,0

(-) concentração não utilizada no ensaio para o organismo bioindicador.

**Tabela 2.** Porcentagem de mortalidade (%) dos organismos testes durante os ensaios com o Toltrazuril.

Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	<i>Lemna minor</i>	<i>Pomacea canaliculata</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	<i>Daphnia magna</i>
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3,0	-	6,7	7,3	-	-
3,5	-	-	48,3	-	-
4,0	-	-	44,3	50,0	-
4,5	-	-	92,7	-	-
5,0	-	33,3	92,7	-	-
6,0	-	-	-	56,0	-
7,0	-	40,0	-	-	-
8,0	-	-	-	67,0	-
10,0	-	60,0	-	100,0	0,0
13,0	-	80,0	-	-	-
16,0	-	86,7	-	-	-
19,0	-	100,0	-	-	-
25,0	-	-	-	--	80,0
50,0	-	-	-	-	100,0
60,0	26,0	-	-	-	-
70,0	28,0	-	-	-	-
75,0	-	-	-	-	100,0
80,0	32,0	-	-	-	-
90,0	35,0	-	-	-	-
100,0	49,0	-	-	-	-

(-) concentração não utilizada no ensaio para o organismo bioindicador.

**Tabela 3.** Classificação ecotoxicológica e Risco Ambiental do Florfenicol e do Toltrazuril para organismos aquáticos.

Fármacos	<i>Lemna minor</i>	<i>Pomacea canaliculata</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	<i>Daphnia magna</i>
<b>Classificação Ecotoxicológica*</b>					
<b>Florfenicol</b>	PT	PNT	PNT	PNT	PNT
<b>Toltrazuril</b>	PNT	MT	MT	MT	PT
<b>Risco Ambiental</b>					
<b>Florfenicol</b>	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio
<b>Toltrazuril</b>	Baixo	Médio	Médio	Médio	Médio

\*PNT: praticamente não tóxico; MT: moderadamente tóxico; PT: pouco tóxico.

## DISCUSSÃO

*Lemna minor* foi o único bioindicador estudado que manifestou a toxicidade do florfenicol possível de calcular a CL50 e foi mais tolerante a este fármaco do que a *L. gibba* (CL50;7d 2,33 mg L<sup>-1</sup>) para a oxitetraciclina (OTC) (PRO *et al.*, 2003), para a doxiciclina, clortetraciclina e tetraciclina (CL50;7d de 219 a 1010 µg L<sup>-1</sup>) (BRAIN *et al.*, 2004). Os antibióticos citados são de grupos distintos, o que levou à diferença de resposta da toxicidade para a planta.

Os antibióticos são tóxicos para algas e cianobactérias e este é o principal motivo que levou a União Européia (EMA/CVMP) a tornar o ensaio de toxicidade dos antibióticos obrigatório para cianobactérias (EMA, 1998). Esta toxicidade é explicada porque os antibióticos foram desenvolvidos para afetar organismos unicelulares procariotos e estes são mais próximos estruturalmente às microalgas unicelulares do que a organismos pluricelulares como microcrustáceos e peixes (FERREIRA *et al.*, 2007).

*Lemna minor* não apresentou resposta de efeito tóxico do TOL até 100 mg L<sup>-1</sup>, assim como outros fármacos utilizados na aquicultura: o diflubenzuron (CL50;7d > 100,0 mg L<sup>-1</sup>) (SOUZA *et al.*, 2011) e o teflubenzuron, para a mesma espécie (CL50;7d > 1.000,0 mg L<sup>-1</sup>) (MEDEIROS *et al.*, 2013).

O caramujo *P. canaliculata* está em fase inicial de estudo como bioindicador, porém há na literatura estudos de toxicidade de extratos de plantas como molusquicidas para seu controle. As plantas *Cyperus rotundus* e *Derris elliptica* apresentam CE50 de 23,68 e 133,20 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (RUAMTHUM *et al.*, 2010) e *Barringtonia racemosa*, 70,71 mg L<sup>-1</sup> (MUSMAN, 2010); sendo assim, o TOL foi mais tóxico para este organismo do que os extratos citados.

O gênero *Pomacea* sp. foi mais sensível a alguns fármacos sem registro para aquicultura, como o extrato de folhas secas de neem (1,68 mg L<sup>-1</sup>), oxicloreto de cobre (0,20 mg L<sup>-1</sup>), óxido de cobre (0,47 mg L<sup>-1</sup>) PIYATIRATITIVORAKUL *et al.*, 2006) e sulfato de cobre (0,07 mg L<sup>-1</sup>) (VENTURINI *et al.*, 2008) do que o TOL. Isso demonstra que o estudo ecotoxicológico caracteriza o fármaco quanto a sua segurança

quando estudado desde sua fase inicial de prospecção.

Os peixes apresentam toxicidade moderada do TOL, ou seja, uma maior toxicidade do que o peixe *Poecilia reticulata* sofreu ao diflubenzuron (152,0 mg L<sup>-1</sup>) (SOUZA *et al.*, 2011) e o teflubenzuron (2707,87 mg L<sup>-1</sup>) (MEDEIROS *et al.*, 2013). *Piaractus mesopotamicus* foi o mais sensível ao TOL, porém apresenta limitações como bioindicador, visto que apresenta desova uma vez ao ano e isso implica em baixa disponibilidade de jovens para os ensaios ecotoxicológicos. Assim, para este fármaco, *H. eques* apresenta sensibilidade satisfatória e preenche todos os requisitos de um bom bioindicador.

Os peixes *P. mesopotamicus* e *H. eques* não apresentaram efeitos tóxicos do FFC em concentrações até 100 mg L<sup>-1</sup> diferentemente de *P. mesopotamicus* para a oxitetraciclina (7,6 mg L<sup>-1</sup>) (CARRASCHI *et al.*, 2011b). Estes antibióticos são de grupos diferentes, o que interfere no modo de ação e na toxicidade.

*Daphnia magna* foi mais tolerante ao TOL do que o teflubenzuron (CE50;48h 0,17 µg L<sup>-1</sup>) (MEDEIROS *et al.*, 2013), isto porque o TFB é inibidor de síntese de quitina, material que constitui a carapaça desses organismos.

A OECD (2009) determina que os testes de toxicidade aguda sejam realizados em concentrações de até 100,0 mg L<sup>-1</sup>, pois a ausência de mortalidade nesta concentração indica que o organismo não é do grupo mais sensível para a substância em exposição à curto prazo. Nesse trabalho, foram utilizadas concentrações de até 100,0 mg L<sup>-1</sup> e, com 99% de confiança, o valor da (CE/CL50) do FFC para *P. canaliculata*, *P. mesopotamicus*, *H. eques* e *D. magna* e a CL50 do TOL para *L. minor* foi superior à concentração limite de 100,0 mg L<sup>-1</sup>.

Os bioindicadores ou sentinelas são organismos ecologicamente importantes e os seus biomarcadores específicos são indicadores de respostas sensíveis e propiciam: 1) alerta precoce de danos ambientais; 2) avaliação de efeito integrado de estressores ambientais sobre a saúde dos organismos, população e comunidade e 3) alerta a perigos potenciais para a saúde humana com base nos biomarcadores (ADAMS e

GREELEY, 2000). Por meio dos estudos ecotoxicológicos, em condições controladas, os bioindicadores fornecem informações de como os organismos respondem a pressões ambientais em seu ambiente natural (ADAMS e GREELEY, 2000). Assim, *L. minor* é um bom bioindicador da toxicidade do FFC e *P. mesopotamicus*, do TOL, pois demonstram a presença destes xenobióticos por meio da mortalidade.

Assim, o FFC é seguro para o uso na aquicultura devido à classificação ecotoxicológica e por não causar toxicidade para a maioria dos bioindicadores. O TOL deve ser utilizado com cautela, pois apresenta diferentes classificações ecotoxicológicas e causa médio risco ambiental para os bioindicadores. Dessa forma, como o TOL é utilizado na forma de banho terapêutico, sugere-se que o efluente de tanques no qual foi utilizado este fármaco deve ser tratado antes do seu descarte para o ambiente.

## CONCLUSÃO

*Lemna minor* é o melhor bioindicador para o florfenicol, pois foi o único organismo que demonstrou resposta de toxicidade aguda deste fármaco, e *H. eques*, do toltrazuril. O florfenicol é seguro e o toltrazuril necessita ser utilizado com cautela e deve-se tratar o efluente antes do descarte no ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2009 NBR 12713. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda - Método de ensaio com Daphnia ssp (Crustacea, Cladocera)*. 3ª ed. São Paulo. 22p.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2011 NBR 15088: *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes*. São Paulo. 19p.
- ADAMS, S.M. e GREELEY, M.S. 2000 Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123: 103-115.
- ATHANASSOPOULOU, F.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E.; RAGIAS, V.; TAVLA, J.; CHRISTOFILLOYANIS, P.; VATSOS, I. 2004 Efficacy and toxicity of orally administered anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 217-226.
- BRAIN, R.A.; JOHNSON, D.J.; RICHARDS, S.M.; SANDERSON, H.; SIBLEY, P.K.; SOLOMON, K.R. 2004 Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:371-382.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M.; POWERS, C.W.; CLARKE, J.H.; BROWN, K.; KOSSON, D.; NILES, L.; DEY, A.; JEITNER, C.; PITTFIELD, T. 2013 Determining Environmental Impacts for Sensitive Species: Using Iconic Species as Bioindicators for Management and Policy. *Journal of Environmental Protection*, 4: 87-95.
- CARRASCHI, S.P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J.G.; CASTRO, M.P.; BORTOLUZZI, N.L.; GÍRIO, A.C.F. 2011a Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63: 579-583.
- CARRASCHI, S.P.; SHIOGIRI, N.S.; VENTURINI, F.P.; CRUZ, C.; GIRIO, A.C.F.; MACHADO NETO, J.G. 2011b Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(2): 115-122.
- CRUZ, C.; CUBO, P.; GOMES, G. R.; VENTURINI, F. P.; GUILHERME, P.E.; PITELLI, R.A. 2008 Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 3: 53-55.
- DUFT, M.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; TILLMANN, M.; MARKERT, B.; OEHLMANN, J. 2003 Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(1): 145-152.
- EMEA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1998 *Enrofloxacin*. Anexo I. Lista das denominações, forma farmacêutica, dosagem do medicamento veterinário, espécies animais, via de

- administração e requerente nos estados-membros, 10p.
- FERREIRA, C.S.G.; NUNES, B.A.; HENRIQUES-ALMEIDA, J.M.M.; GUILHERMINO, L. 2007 Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 452-458.
- GOKTEPE, I.; PORTIER, R.; AHMEDNA, M. 2004 Ecological risk assessment of Neem based pesticides. *Journal of Environmental Science Health, Part B*, 39(2): 311-320.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. 1977 Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicoty bioassays. *Environmental Science Techonollogy*, 7: 714-719.
- HELFRICH, L.A.; WEIGMANN, D.L.; HIPKINS, P.; STINSON, E.R. 1996 *Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems*. Virginia Cooperative Extension. Virginia State University. Virginia, 24p.
- LI, T.Y. e XIONG, Z.T. 2004 Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna poucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2): 174-179.
- MSD. 2009 *Aquaflor. Florfenicol*. Technical Monograph for catfish health professionals. 36p.
- MEHLHORN, H.; SCHMAHL, G.; HABERKORN, A. 1988 Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. *Parasitology*, 75: 64-66.
- MEDEIROS, L.S.; SOUZA, J.P.; WINKALER, E.U.; CARRASCHI, S.P.; CRUZ, C.; SOUZA-JÚNIOR, S.S.; MACHADO-NETO, J.G. 2013 Acute toxicity and environmental risk of teflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48: 600-606.
- MUSMAN, M. 2010 Toxicity of *Barringtonia racemosa* (L.) Kernel Extract on *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae). *Tropical Life Sciences Research*, 21(2): 41-50.
- NORDMO, R.; VARMA, K.J.; SUTHERLAND, I.H.; BROKKEN, E.S. 2006 Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmon salar* L.: field evaluation of efficacy against furunculosis in Norway. *Journal Fish Disease*, 17: 239-244.
- OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 2002 *Guidelines for the Testing of Chemicals, Lemna sp. Growth inhibition test*. Paris. 22p.
- OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 2009 OECD DRAFT GUIDANCE DOCUMENT. *The Threshold Approach for Acute Fish Toxicity Testing*, Paris. 4p.
- PIYATIRATITIVORAKUL, P.; RUANGAREERAT, S.; VAJARASATHIRA, B. 2006 Comparative toxicity of heavy metal compounds of the juvenile golden apple snail, *Pomacea sp. Fresenius Environmental Bulletin*, 15(5): 379-384.
- PRO, J.; ORTIZ, J.A.; BOLEAS, S.; FERNÁNDEZ, C.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J.V. 2003 Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 290-295.
- RUAMTHUM, W.; VISETSON, S.; MILNE, J.R.; BULLANGPOTI, V. 2010 Toxicity of botanical insecticides on golden apple snail (*Pomacea canaliculata*). *Communications in Agricultural Applied Biological Sciences*, 75(2): 191-7.
- SCHMAHL, G. e MEHLHORN, H. 1988 Treatment of fish parasites 2. Effects of sym. Triazinona (toltrazuril) on monogenea. *Parasitology Research*, 75: 132-145.
- SOUZA, J.P.; MEDEIROS, L.S.; WINKALER, E.U.; MACHADO-NETO, J.G. 2011 Acute toxicity and environmental risk of diflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. *Pesticidas*, 21: 1-12.
- VENTURINI, F.P.; CRUZ, C.; PITELLI, R.A. 2008 Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). *Acta Scientiarum Biological Science*, 30(2): 179-184.
- ZUCKER, E. 1985 *Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish*. USEPA Publication, Washington, v. 540, 9: 85-006.