



## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA SULFAMETAZINA EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Eliane Alves de **Oliveira**<sup>1</sup>; Maria Lídia **Carra**<sup>2</sup>; Victor Colloti **Chalupe**<sup>3</sup>; Fernanda Garcia **Sampaio**<sup>4</sup>;  
Cláudio Martín **Jonsson**<sup>5</sup>

Nº 14413

**RESUMO** – *Dentre os fármacos, o grupo dos antibióticos, entre eles as sulfonamidas, é considerado um dos mais importantes. Estes compostos são extensivamente utilizados na medicina humana, veterinária e na aquicultura, com o propósito de prevenir ou tratar infecções microbianas. Essas substâncias podem acumular-se no solo, sofrer lixiviação ou, ainda, ser transportada via escoamento superficial para os corpos hídricos.*

*A fim de alcançar um maior entendimento sobre os efeitos das sulfonamidas, avaliou-se a toxicidade aguda da sulfametazina utilizando-se duas espécies de invertebrados aquáticos (*Daphnia similis* e *Artemia salina*) e o peixe (*Piaractus mesopotamicus*). Foram determinados os valores de concentração efetiva média (CE50-48h), relacionada à imobilidade dos microcrustáceos equivalente a 77,5-48h e >1000 mg L<sup>-1</sup> para *D. similis* e *A. salina*, respectivamente. Para o peixe *P. mesopotamicus*, não houve efeito letal. Considerando-se que estes compostos são administrados em doses elevadas, a avaliação do seu impacto em toda biota aquática parece aconselhável. Os valores, portanto auxiliam para o estabelecimento de concentrações máximas permissíveis de sulfametazina nos corpos de água.*

**Palavras-chaves:** Avaliação de Risco, Sulfametazina, *Daphnia similis*, *Artemia salina*, *Piaractus mesopotamicus*

1 Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP; elia59@live.com

2 Colaborador, Bolsista Embrapa: Graduada em Engenharia Ambiental, FAJ, Jaguariúna-SP. malidiacarra@gmail.com

3 Colaborador, Bolsista PIBIC: Graduação em Medicina Veterinária, FAJ, Jaguariúna-SP.

4 Colaborador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; fernanda.sampaio@embrapa.br

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



**ABSTRACT** - Among the drugs, the group of antibiotics, including sulfonamides, is considered one of the most important. These compounds are extensively used in human, veterinary medicine and aquaculture, with the purpose of preventing or treating microbial infections. These substances can build up in the soil, leachate or even be transported via superficial runoff to water bodies.

In order to achieve a better understanding of the effects of sulfonamides, the acute toxicity of sulfamethazine was evolved using two species of aquatic invertebrates (*Daphnia similis* and *artemia salina*) and fish (*Piaractus mesopotamicus*). Determined the average effective concentration values were ( $EC_{50-48h}$ ), related to immobility of microcrustaceans equivalent to  $77.5-48h$  and  $>1000\text{ mg L}^{-1}$  for *D. similis* and *A. salina*, respectively. For the fish *P. mesopotamicus* not lethal effect was found. Considering that these compounds are administered in high doses, to assess their impact on aquatic biota all seems advisable. values thus help to establish allowable maximum concentrations of sulfamethazine in water bodies.

**Key-words:** Risk assessment, sulfamethazine, *Daphnia similis*, *Artemia salina*, *Piaractus mesopotamicus*

## 1 INTRODUÇÃO

A presença de substâncias farmacológicas no meio ambiente advém do uso intensivo dos mesmos no tratamento de doenças. Dentre os fármacos, o grupo dos antibióticos é considerado um dos mais importantes. Estes compostos são extensivamente utilizados na medicina humana, veterinária e na aquicultura, com o propósito de prevenir ou tratar infecções microbianas. (BOOTH, 1992)

O grupo das sulfonamidas é um dos mais utilizados na medicina veterinária. Uma vez no ambiente, essas substâncias podem acumular-se no solo, sofrer lixiviação ou, ainda, ser transportada via escoamento superficial para os corpos hídricos. As sulfonamidas utilizadas na aquicultura são liberadas diretamente nas águas superficiais.

A freqüente identificação de fármacos residuais no ambiente vem gerando um grande interesse no monitoramento e no comportamento dessas substancias sobre organismos não-alvo.

A fim de alcançar um maior entendimento sobre os efeitos das sulfonamidas em ecossistemas aquáticos este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da sulfametazina nos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Artemia salina*, e em peixe (*Piaractus*



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

*mesopotamicus*). Os dois últimos organismos são importantes espécies zooplanctônicas bioindicadoras de ecossistemas de água doce e marinho, respectivamente; além de serem recomendados por órgãos internacionais e nacionais na avaliação de risco e biomonitoramento. O referido peixe é de interesse comercial, neotropical e de ampla distribuição nos corpos aquáticos de ecossistemas do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**Material-teste:** Sulfametazina (4-amino-*N*-(4,6-dimetilpirimidina-2-yl) (benzenesulfonamide) ≥99% de pureza (Sigma-Aldrich). Fórmula:  $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ .

### Organismos-teste e exposição :

#### Microcrustáceos:

***D. similis*:** Utilizaram-se organismos com idade inferior a 24 horas. O invertebrado foi previamente cultivado em aquários de dimensões iguais a 40 x 25 x 15 cm, com água decolorizada com as seguintes características físico-químicas: pH 7,6, dureza total 111,2 mg de  $CaCO_3 \cdot L^{-1}$  e condutividade 0,37hg mS.cm<sup>-1</sup>. Os organismos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a  $20 \pm 2^\circ C$ , luminosidade de 1.000 lux e alimentados com algas das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella pyrenoidosa*.

***A. salina*:** Foram utilizados nauplios deste organismo-teste. Para isso foi preparado um erlenmeyer com um litro de água do mar reconstituída (32,5g de Sera Premium Sea Salt Heinberg/litro de água decolorizada) sob aeração. Foi adicionado aproximadamente 1,25g de cistos de artemia que foram cultivados em temperatura  $20 \pm 2^\circ C$  e luminosidade aproximada de 1000 lux. Após 48 horas, os náuplios de artemias eclodidos destes cistos foram recolhidos.

***Delineamento experimental:*** Neonatos de *D. similis* foram expostos por 48 horas a soluções-teste de sulfametazina nas concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg  $L^{-1}$ . No estudo com *A. salina*, avaliaram-se as concentrações de 0, 500, 600, 700, 800 e 1000 mg $L^{-1}$ . As soluções-teste referem-se às concentrações do fármaco dissolvido em água com as características físico químicas já descritas, sendo que os valores de concentração escolhidos são resultados de estudos preliminares para delimitar as faixas de concentração testadas.

O estudo foi realizado em replicas de 4 recipientes para cada concentração, contendo 5 organismos cada. Os resultados de imobilidade dos organismos face às diferentes concentrações dos agentes químicos, e às 24 e 48 horas de exposição, foram submetidos à análise de próbitos.



Esta permitiu a determinação da CE50-24 e 48h e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de certeza. Utilizou-se o módulo “Probit Analysis” do programa Statgraphics Plus Version 5.1 para tal finalidade.

**Peixe - *P. mesopotamicus*:** Utilizaram-se pacus com peso médio de 20 gramas. Os peixes foram submetidos à aclimação por 7 dias antes da exposição ao fármaco em tanques com água declorizada, oxigênio dissolvido 7,35, pH  $7,6 \pm 0,11$ , temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 12 horas e alimentados uma vez ao dia. Tais condições ambientais foram mantidas durante a aclimação e o experimento, à exceção da alimentação, que foi suspensa a partir do primeiro dia de exposição à sulfametazina.

***Delineamento experimental:*** Sete dias antes da exposição ao agente químico, foram formados grupos com 5 animais cada, sendo estes alocados em aquários observando-se a proporção aproximada de 1L de água por 1g de peixe. A exposição dos animais ocorreu pelo período de 96 horas, utilizando-se do sulfametazina nas concentrações de 60 mg L<sup>-1</sup>; e 600 mg L<sup>-1</sup> além da manutenção de grupos-controle. Para cada uma das concentrações testadas foram expostos 2 grupos de peixes, sendo que para os controles foram usados 4 réplicas, e para concentrações de 60 e 600, foram expostos 5. A definição das concentrações utilizadas foi baseada em estudos prévios. Os organismos não foram alimentados durante o período de exposição. Registrou-se a mortalidade nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, assim como alterações comportamentais. A determinação da concentração letal média (CL50-96h) e seu intervalo de confiança 95% foi determinada conforme descrito anteriormente.

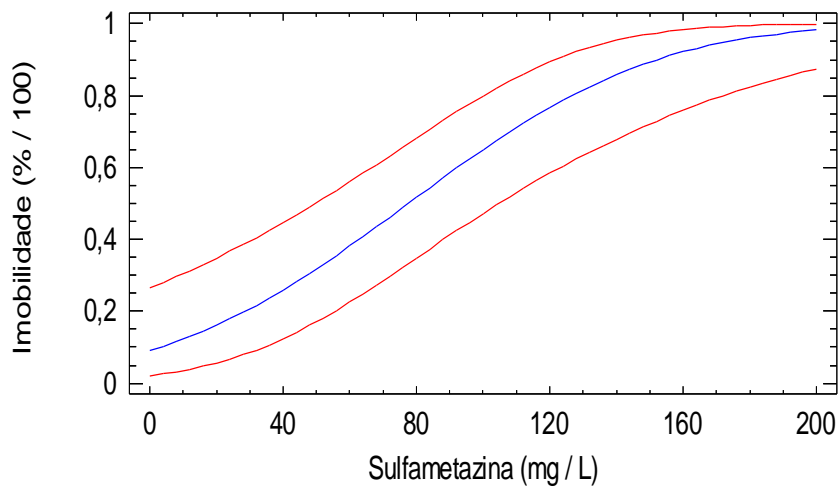
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma avaliação rápida associada ao impacto de antibióticos sobre organismos não-alvo é realizada através de estudos de toxicidade aguda. Estes permitem comparar a toxicidade entre espécies e ainda servem como base para o delineamento de estudos de toxicidade crônica. Estes últimos são relevantes para a estimativa de efeitos adversos, por períodos prolongados, de quantidades residuais nos compartimentos ambientais.

No presente trabalho, *D. similis* foi o organismo mais sensível aos efeitos da sulfametazina, apresentando valores de CL50 24h e 48 h, respectivamente de 221,80 (155,03 – 282, 35) mg L<sup>-1</sup> e 77,57 ( 49,72 – 104, 74) mg L<sup>-1</sup>. Os dados da Figura 1 demonstram um decréscimo da mobilidade em função do aumento concentração do fármaco para o período de exposição de 48 horas. Foram ajustadas curvas dose resposta gerando as equações do tipo  $\varnothing = -1,05491 + 0,00475599x$  e  $\varnothing = -1,33412 + 0,0171992 x$ , respectivamente para os períodos de 24 e 48 horas. Nessas equações “ $\varnothing$ ” representa a função de probito e “x” é concentração em mg L<sup>-1</sup> de sulfametazina.



Por outro lado, o ajuste de curvas não foi possível para *A. salina*, devido à ausência de correlação de efeito em função da concentração. Pois mesmo na maior concentração avaliada constatou-se carência total de alteração na mobilidade em algumas réplicas (Tabela 1). Assim sendo atribui-se para *A. salina* valores de CE50-24 e 48 horas superiores a 1000 mg L<sup>-1</sup>.



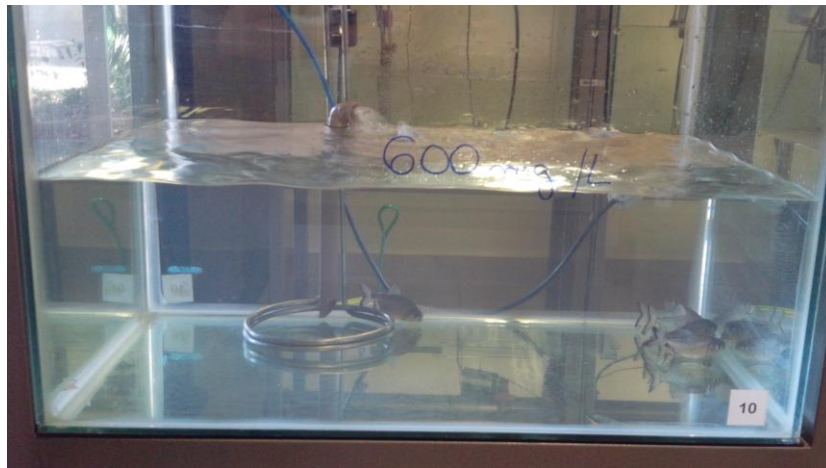
**Figura 1.** Relação dose-resposta e intervalo de confiança 95% para *D. similis* submetida a diferentes concentrações de sulfametazina durante 48 horas.

	Sulfametazina (mg L <sup>-1</sup> )						
	0	500	600	700	800	900	1000
Réplica 1	20	0	20	0	0	0	20
Réplica 2	20	0	0	0	0	0	20
Réplica 3	0	0	20	0	0	20	0
Réplica 4	0	0	0	0	0	20	0

**Tabela 1.** Imobilidade (%) de *A. salina* exposta a diferentes concentrações de sulfametazina durante 48 horas.

Segundo a classificação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. E.P.A.), compostos com valores de CE50-48h  $>10$  e  $<100$  mg L<sup>-1</sup> são considerados “fracamente tóxicos”, enquanto que os que apresentam esse parâmetro com um valor superior a 100 mg L<sup>-1</sup> são considerados “praticamente não tóxicos”. Portanto, os dados obtidos neste trabalho enquadram a sulfametazina nessas categorias quanto a sua toxicidade para *D. similis* e para *A. salina*, respectivamente.

Para os peixes expostos à sulfametazina, não foram constatadas letalidades, mesmo as concentrações testadas sendo maiores do que as expelidas em corpos d’água, constatou-se dificuldade respiratória em alguns dos peixes do grupo de 600 mgL<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Peixes expostos à concentração de 600 mg L<sup>-1</sup>

Portanto para os peixes da espécie *P. misopotamicus*, os valores de CE-50 estão acima de 600 mg L<sup>-1</sup>.

Os valores de CE50-48h por nós relatados para *D. similis* de 77,57 são próximos aos citados por Kyunghee et al. (2012) para outros microcrustáceos (113 e 122 mg L<sup>-1</sup> para *D. magna* e *Moina macrocopa*, respectivamente).

Curiosamente a toxicidade para *Daphnia similis* demonstrou ser mais de 13 vezes superior que para *Artemia salina* sendo que este organismo suportou concentrações superiores a 1000 mL<sup>-1</sup>. Porém, a maior susceptibilidade do gênero *Daphnia* em relação à *Artêmia* tem sido relatada (Calleja et al., 1994).

Não existem informações na literatura a respeito da toxicidade da sulfametazina em artêmias, entretanto sabe-se que este microcrustáceo é pouco susceptível aos efeitos de outras sulfonamidas e antibióticos como a sulfadimetoxina (Migliore et al. 1993), oxitetraciclina, florfenicol (Ferreira et al., 2007), aminosidina e flumequina (Migliore et al. 1997) com valores de CL50-48h, respectivamente, de 851, 806;  $>889$ ; 2200 e 307 mg mL<sup>-1</sup>).



#### 4 CONCLUSÃO

A concentração máxima permissível de sulfametazina, assim como de outros antibióticos não está descrita na Resolução n. 357 de 2005 do CONAMA. Com vistas a auxiliar esta legislação e considerando o valor de CE50 para espécie mais sensível, podem-se aplicar fatores de incerteza para estimar valores de concentração máxima permissível. Aplicando-se um fator da ordem de 10 para a prevenção de efeitos crônicos, e de 437 devido à variabilidade de sensibilidade entre invertebrados aquáticos (Elmegaard & Jagers op Akkerhuis, 2000), estima-se um valor de concentração máxima permissível de 0,017 mg L<sup>-1</sup> de sulfametazina para a proteção destes organismos.

Não se tem evidências que a sulfametazina tenha efeitos carcinogênicos para humanos, porém exposição à longos prazos vem a ser carcinogênico para animais pois estes são mais sensíveis e susceptíveis ao efeitos do fármaco.(HOLDER, 1981). Isso aponta a importância de se estender estudos sobre sulfonamidas em outras espécies de animais.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade de estágio bem como o apoio financeiro. Também à Fapesp e CNPq devido ao uso de equipamentos financiados por estas instituições.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOTH, N.H.; McDONALD, L. M. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 997p.
- CALLEJA, M.C.; Persoone, G.; Geladi, P. **Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of *in vitro* cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates**. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 26, 69-78, 1994.
- ELMEGGARD, N.; Jagers op Akkerhuis, G.A.J.M. **Safety factors in pesticide risk assessment**. Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325. 2000. 57 p.
- FERREIRA, C.S.; Nunes, B.A.; Henriques-Almeida, J.M.; Guilhermino, L. **Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica***. Ecotoxicol Environ Saf. 67(3):452-8. 2007



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

FIGUEIREDO, L.A.; Sousa, B.A.I.; Cezarino, L.; Torres, N.H.; Tornisielo, V.L. **Avaliação da toxicidade aguda dos antimicrobianos monensina, norfloxacin, enrofloxacin e sulfametazina para o organismo teste daphnia magna.** Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Piracicaba/SP.

HOLDER, C.L., Thompson, H.C., Jr & Bowman, M.C. **Trace analysis of sulfamethazine in animal feed, human urine, and wastewater by electron capture gas chromatography.** J. chromatogr. Sci., 19, 625–633. 1981

KYUNGHEE, J.; Sunmi, K.; Sunyoung, H.; Jihyun, S.; Sangwoo, L.; Yoonsuk, P.; Kyunghee, C.; Young-Lim, K.; Pan-Gyi, K.; Jeongim, P.; Kyungho, C. **Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe?** Ecotoxicology, 21:2031–2050, 2012

LITTLEFIELD, N.A., Sheldon, W.G., Allen, R. & Gaylor, D.W. **Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: Two-generation exposure.** Foodchem. Toxicol., 28,157–167. 1990

MIGLIORE, L.; Brambilla, G.; Grassitellis, A.; Dojmi di Delupis, G. **Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in Artemia (Crustacea, Anostraca).** Int. J. Salt Lake Res., 2 (2), 141-152, 1993.

MIGLIORE, L., Civitareale, S., Brambilla, G., Dojmi DiDelupis, G. **Toxicity of several important agricultural antibiotics to Artemia.** Water Res., 31, 1801–1806, 1997.

USEPA Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos