

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA**

**RHAISSA DAYANE CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DA LOSARTANA POTÁSSICA  
EM *DAPHNIA MAGNA* E *DESMODESMUS SUBSPICATUS***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA  
2017**

**RHAISSA DAYANE CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DA LOSARTANA POTÁSSICA  
EM *DAPHNIA MAGNA* E *DESMODESMUS SUBSPICATUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR como requisito de obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wanessa Algarte Ramsdorf

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Regina Rocha Martins

CURITIBA  
2017

**RHAISSA DAYANE CARNEIRO**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DA LOSARTANA POTÁSSICA  
EM *DAPHNIA MAGNA* E *DESMODESMUS SUBSPICATUS***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1 – Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas**  
**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Membro 2 – Profa. Dra. Flávia Yoshie Yamamoto**  
**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Orientadora – Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramssdorf Nagata**  
**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Coorientadora – Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins**  
**Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

**Coordenador de Curso – Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria**

Curitiba, 04 de dezembro de 2017.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado sabedoria, paciência, discernimento, forças e determinação para enfrentar as dificuldades que encontrei pelo caminho.

À minha família, especialmente meus pais Rosiane e Márcio, meu padrasto Sérvulo, madrasta Marta, minhas irmãs Rhafaela e Mayara e meus sobrinhos Cauã e Pietro, pelo apoio incondicional, carinho, compreensão e dedicação.

Ao André e sua família, por me apoiarem sempre.

Ao Ivan Pereira e sua família, por me receberem com muito carinho em sua casa, durante o primeiro período da graduação que fiz no Campus Pato Branco.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me proporcionar uma formação gratuita e de qualidade.

À professora Wanessa Algarte Ramsdorf, pelas oportunidades, ensinamentos, dedicação e confiança em todos os anos que permaneci no Laboratório de Ecotoxicologia.

À professora Lúcia Regina Rocha Martins, pela ajuda valiosa com os experimentos de *Desmodemus subspicatus*, pelos ensinamentos e além de aceitar ser minha coorientadora.

Às professoras Adriane Martins de Freitas e Flávia Yoshie Yamamoto, pelos ensinamentos e por aceitarem ser banca avaliadora.

Às professoras Danielle e Érika, pela força, conversas e conselhos.

Ao professor Marcus Vinicius de Liz pelas oportunidades, ensinamentos, dedicação e confiança em todos os anos que estagiei no Laboratório de Química Analítica.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR, Regiane, Luís, Vinícius, Eliane e Monike, pela convivência, apoio, respeito e bons momentos.

À amiga, Camila Gama, por estar comigo nos momentos mais difíceis, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos amigos, Jéssika, Priscilla, Avany, Cassiana, Luanne, Pamella, Luiz, Mikaela, Everaldo e Bruno, pelo incentivo e amizade durante a graduação.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Obrigada a todos, vocês fizeram deste trabalho realidade.

## RESUMO

CARNEIRO, Rhaissa Dayane. **Avaliação da ecotoxicidade da losartana potássica em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*. 50pg.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

Os medicamentos anti-hipertensivos estão entre os fármacos mais encontrados na natureza, sendo que as principais rotas de entrada destes resíduos farmacológicos no ambiente são através da excreção de pacientes e do descarte inadequado nas redes de esgotos. O interesse em conhecer os efeitos que essas substâncias podem causar em organismos aquáticos de relevância ecológica aumenta gradualmente. A losartana potássica é o principal representante dessa classe de medicamentos, sendo o fármaco mais consumido no Brasil nos últimos anos e encontrado em corpos d'água em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da losartana potássica em organismos aquáticos de dois níveis tróficos diferentes, utilizando bioensaios crônicos com *Desmodesmus subspicatus*, conforme a ABNT NBR 12648:2011, bioensaio agudo com *Daphnia magna*, conforme a ABNT NBR 12713:2016. Também foi avaliado o potencial genotóxico deste composto em *Daphnia magna*, através do ensaio cometa. No ensaio com *Desmodesmus subspicatus*, o valor obtido de  $\text{CEO}_{50}$  foi de  $27,9308 \pm 0,0751 \text{ mg L}^{-1}$ . Para *Daphnia magna*, o valor obtido de  $\text{CE}_{50}$  foi de  $303,69 \pm 16,38 \text{ mg L}^{-1}$ , observando assim maior sensibilidade do organismo *Desmodesmus subspicatus*. Em relação à genotoxicidade do composto foi possível determinar danos significativos ao DNA para as concentrações estudadas. Com os bioensaios realizados obtiveram-se dados que auxiliaram na compreensão dos efeitos deste fármaco nos organismos de ambientes aquáticos naturais, evidenciando a toxicidade frente aos organismos-testes empregados e destacando a importância de estudos que investiguem os efeitos adversos de substâncias químicas nos ambientes naturais.

**Palavras-chave:** Fármaco anti-hipertensivo. Bioensaios. Genotoxicidade. Ensaio cometa.

## ABSTRACT

CARNEIRO, Rhaissa Dayane. **Ecotoxicity evaluation of losartan potassium in *Daphnia magna* and *Desmodesmus subspicatus*. 50p.** (Course Completion Work) - Bachelor in Chemistry, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2017.

Antihypertensive drugs are among the most commonly drugs found in nature, and the main entry routes of these pharmacological residues into the environment are through the excretion of patients and inappropriate disposal in sewage systems. The interest about knowing the effects that these substances may have on ecologically relevant aquatic organisms increases gradually. Losartan potassium is the main agent of this class of drugs, being the most consumed drug in Brazil in recent years and found in water bodies at concentrations ranging from  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The objective of this study was to evaluate the effects of losartan potassium in aquatic organisms of two different trophic levels, using chronic bioassays with *Desmodesmus subspicatus*, according to ABNT NBR 12648:2011, and acute bioassays with *Daphnia magna*, according to ABNT NBR 12713:2016. It was also evaluated the genotoxic potential of this compound in *Daphnia magna* through the comet assay. In the bioassay with *Desmodesmus subspicatus*, the  $\text{LOEC}_{50}$  value was  $27.9308 \pm 0.0751 \text{ mg L}^{-1}$ . For *Daphnia magna*, the  $\text{EC}_{50}$  value was  $303.69 \pm 16.38 \text{ mg L}^{-1}$ , thus observing greater sensitivity of the organism *Desmodesmus subspicatus*. In relation to the compound genotoxicity, it was possible to determine significant DNA damage for the studied concentrations. With the performed bioassays, it was obtained data that helped to understand the effects of this drug in organisms of natural aquatic environments, showing the toxicity to the test organisms used and highlighting the importance of studies investigating adverse effects of chemical substances in natural environments.

**Key words:** Antihypertensive drug. Bioassays. Genotoxicity. Comet assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da losartana potássica.....	14
Quadro 1 - Propriedades da losartana potássica .....	15
Figura 2 – Atuação dos bloqueadores dos receptores da angiotensina.....	16
Figura 3 - Estrutura química do metabólito ativo de ácido carboxílico (EXP-314).....	17
Figura 4 – <i>Daphnia magna</i> .....	21
Figura 5 – <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	22
Figura 6 – Representação da câmara de Neubauer.....	27
Figura 7 – Representação gráfica dos índices de mobilidade da <i>Daphnia magna</i> ....	32
Figura 8 – Representação gráfica dos índices de inibição do crescimento algáceo.	34
Figura 9 – Classificação visual dos danos (0-3) no material genético da <i>Daphnia magna</i> .....	34
Figura 10 – Gráfico box-plot dos resultados do Ensaio Cometa em <i>Daphnia magna</i> .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de losartana potássica detectados no meio ambiente em estações de tratamento .....	19
Tabela 2 – Dados ecotoxicológicos da losartana potássica.....	20
Tabela 3 - Medianas obtidas a partir dos escores de cada dano.....	35



## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	10
2.OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1 Fármacos anti-hipertensivos.....	13
3.2 Losartana Potássica.....	14
3.3 Losartana no Ambiente.....	17
3.4 Monitoramento ecotoxicológico.....	19
3.5 <i>Daphnia magna</i> como organismo-teste.....	20
3.6 <i>Desmodesmus subspicatus</i> como organismo-teste.....	22
3.7 Ensaio Cometa.....	23
4.METODOLOGIA.....	24
4.1 Reagentes.....	24
4.2 Cultivo de <i>Daphnia magna</i> .....	24
4.3 Testes de Sensibilidade e carta controle de <i>Daphnia magna</i> .....	24
4.4 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	25
4.5 Cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	26
4.6 Teste de toxicidade crônica com <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	27
4.7 Ensaio cometa com <i>Daphnia magna</i> .....	29
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Teste de sensibilidade <i>Daphnia magna</i> e carta controle.....	31
5.2 Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i> .....	31
5.3 Teste de sensibilidade <i>Desmodesmus subspicatus</i> e carta controle.....	32
5.4 Toxicidade crônica para <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	33
5.5 Ensaio cometa com <i>Daphnia magna</i> .....	34
6.CONCLUSÃO.....	37
7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE A.....	45
APÊNDICE B.....	46
ANEXO A.....	47
ANEXO B.....	48
ANEXO C.....	49
ANEXO D.....	50

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente apresenta grande interesse, devido ao fato dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e em águas naturais, em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  (GUIMARÃES et al., 2012; PEREIRA et al., 2016; OOSTERHUIS et al., 2013; LARSSON, et al., 2007). Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs, sendo assim muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional de água (BILA et al., 2003). As principais rotas de entrada destes medicamentos no ambiente são através das redes de esgotos, por meio da excreção de pacientes e do descarte inapropriado de medicamentos não utilizados ou com prazo de validade expirado (BOUND, KITSOU, VOULVOULIS, 2006).

Os fármacos anti-hipertensivos são utilizados em todo mundo. São indicados para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica e contribuem para o controle de doenças cardiovasculares (YAMAMOTO, 2014). A losartana potássica é o principal representante dessa classe de medicamentos, sendo o anti-hipertensivo mais consumido no Brasil. Segundo Alvim (2016), a losartana potássica no ano de 2015 foi o quarto medicamento mais vendido e o primeiro no quesito faturamento no Brasil.

Os medicamentos anti-hipertensivos estão entre as dez classes de medicamentos mais encontradas no ambiente aquático (SANTOS et al., 2010). Quando administrada por via oral, 4% da dose de losartana potássica é excretada na urina em sua forma inalterada e 6% na forma de seu metabólito ativo (MERCK, 2015). Após a administração oral, as concentrações plasmáticas da losartana e do seu metabólito ativo diminuem exponencialmente, com a meia-vida final de aproximadamente de duas horas e de seis a nove horas, respectivamente. Tanto a excreção biliar e quanto a urinária contribuem para a eliminação da losartana potássica e seus metabólitos. Após uma dose oral de losartana potássica marcada com  $^{14}\text{C}$  em humanos, aproximadamente 35% da radioatividade é recuperada na urina e 58%, nas fezes. Após uma dose intravenosa de losartana potássica marcada com  $^{14}\text{C}$  em humanos, aproximadamente 43% da radioatividade é recuperada na urina e 50%, nas fezes (VITAMEDIC, 2016).

A legislação brasileira atual não estipula limites para a concentração ambiental de fármacos, mas segundo a resolução Nº 430 do CONAMA (2011), efluentes lançados não devem ocasionar toxicidade aos organismos aquáticos do corpo receptor. Desta forma, surge a necessidade de investigar as consequências ecotoxicológicas do lançamento de fármacos, principalmente no meio aquático.

Uma das formas de se realizar estudos em ecotoxicologia é através de bioensaios que permitem estudar os efeitos tóxicos de contaminantes ou amostras em organismos vivos. A exposição de organismos a agentes tóxicos ou amostras ambientais, geralmente ocorre por via hídrica. A escolha de organismos representativos do ambiente aquático é muito importante na avaliação de toxicidade de determinado poluente. Geralmente utilizam-se organismos de níveis trópicos diferentes, tendo em vista que estes podem ter sensibilidades distintas (ZAGATTO, 2008).

Tendo em vista o alto consumo de medicamentos atualmente, principalmente os medicamentos anti-hipertensivos e a contaminação que podem causar, estudos para avaliar os danos deste composto em ecossistemas aquáticos devem ser realizados. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a ecotoxicidade aguda e crônica da losartana potássica em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*, respectivamente, e a avaliação da sua genotoxicidade através do ensaio cometa em *Daphnia magna*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ecotoxicidade aguda e a genotoxicidade da losartana potássica em *Daphnia magna* e ecotoxicidade crônica em *Desmodesmus subspicatus*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Monitorar os cultivos de *Desmodesmus subspicatus* e de *Daphnia magna*, confeccionar as cartas-controle e determinar as concentrações teste;
2. Avaliar a ecotoxicidade aguda da losartana potássica em *Daphnia magna*;
3. Avaliar a ecotoxicidade crônica da losartana potássica em *Desmodesmus subspicatus*;
4. Avaliar a genotoxicidade da losartana potássica através do ensaio cometa com *Daphnia magna*.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 Fármacos anti-hipertensivos**

A hipertensão arterial sistêmica é definida como aumento prolongado da pressão arterial sendo maior ou igual 140/90 mmHg (BRUNTON et al., 2012). É uma doença crônico-degenerativa de origem multifatorial, assintomática e de evolução gradativa. Essa doença ocasiona alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo (HARDMAN et al., 1996). Considerado um grave problema de saúde pública e um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares em países industrializados e em desenvolvimento, tal como o Brasil (DAMAS, SOBRINHO, 2016).

Atualmente, a hipertensão atinge aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo e 30 milhões no Brasil, das quais 30% são adultas (GIOLLO-JUNIOR et al., 2014). No Brasil, as mortes decorrentes de doença cardíaca hipertensiva cresceram 11% entre 1996 e 2007, sendo responsáveis por 13% do total de mortes atribuíveis a doenças cardiovasculares (BECK et al., 2016).

Uma forma de controlar a hipertensão arterial é através do tratamento farmacológico dos pacientes, que reduz a morbidade e a mortalidade da doença cardiovascular. A terapia anti-hipertensiva eficiente reduz de forma marcante o risco de acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca e insuficiência renal causados por hipertensão arterial (BRUNTON, 2012).

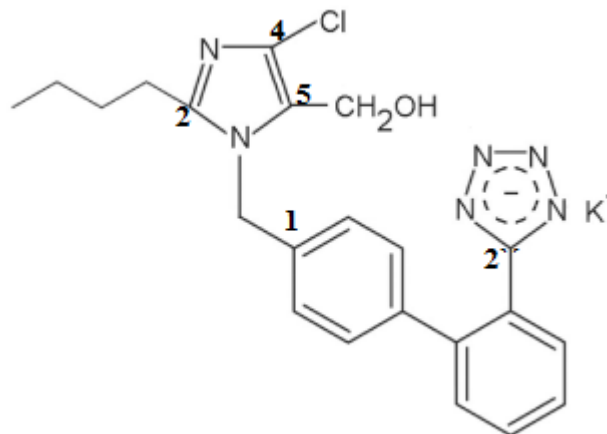
Os anti-hipertensivos constituem uma classe heterogênea de fármacos utilizados, dentre outras indicações, no tratamento da hipertensão arterial. Estes medicamentos são basicamente divididos em 6 grupos: diuréticos, inibidores adrenérgicos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores de canais de cálcio, bloqueadores de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II, vasodilatadores diretos e inibidores diretos de renina (DELUCIA, 2016; KATZUNG, B. G., TREVOR, A. J., 2017).

### 3.2 Losartana Potássica

É o fármaco anti-hipertensivo mais utilizado no Brasil, Segundo Pereira et al. (2016), a losartana foi o fármaco mais vendido no Brasil em 2014, dentre todas as classes de medicamentos. O medicamento de referência é comercializado com o nome Cozaar®, disponibilizada na forma de comprimidos de 50 e 100 mg (MERCK, 2015).

A Figura 1 representa a estrutura química e o Quadro 1 apresenta as principais propriedades físicas e químicas da losartana potássica.

**Figura 1** - Estrutura química da losartana potássica



Legenda: Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2Htetrazol-5-il) [1,1-bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-metanol.

Fonte: BONTIFOLIO et al., 2010

**Quadro 1** - Propriedades da losartana potássica

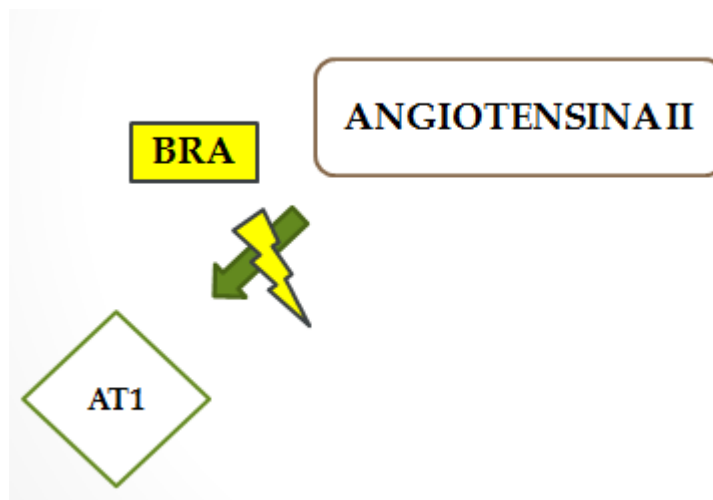
Nome Químico <sup>a</sup>	Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2Htetrazol-5-il) [1,1-bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-metanol
Nome Comercial <sup>e</sup>	Cozaar®
Sinônimos <sup>a,b</sup>	Losartan, Losartana
Fórmula Molecular <sup>a</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>6</sub> O. K
Peso molecular <sup>a</sup>	461,00 g mol <sup>-1</sup>
Número de registro no CAS <sup>a</sup>	124750-99-8
Aspecto <sup>b</sup>	Pó cristalino branco ou quase branco
Coef. partição octanol/água (Log Kow) <sup>b</sup>	3,01
pka <sup>a</sup>	4,9
Solubilidade em água <sup>a</sup>	Solúvel (3.300 mg L <sup>-1</sup> )
Solubilidade em etanol <sup>b</sup>	Solúvel
Volatilidade <sup>b</sup>	Não Volátil
Pressão de Vapor <sup>b</sup>	1,64 x 10 <sup>-26</sup> mm Hg (a 25°C)
Ponto de Fusão <sup>b</sup>	183,5 – 184,5 °C
Coef. Adsorção em solo (Koc) <sup>b</sup>	5,69 x10 <sup>5</sup> L kg <sup>-1</sup>
Estabilidade <sup>c</sup>	Estável à hidrólise e biodegradação. Fotodegradável.
Meia-vida biológica <sup>d</sup>	Losartana potássica: 2 h. Metabólito: 6 - 9 h
Produtos do metabolismo humano <sup>b</sup>	Metabólito do ácido 5-carboxílico (EXP-3174)

Fonte: <sup>a</sup> Godoy (2015); <sup>b</sup> Yamamoto (2014); <sup>c</sup> United States of America-FDA (2002); <sup>d</sup> Merck (2015); <sup>e</sup> MSD (2012). apud (REQUE, 2017)

A losartana potássica é classificada como um bloqueador dos receptores  $AT_1$  da angiotensina II (BRA). A angiotensina II é um importante peptídeo do sistema renina-angiotensina-aldosterona e tem um papel importante na regulação da pressão sanguínea, alterações nos níveis desse hormônio geram efeitos deletérios ao sistema cardiovascular (TRAPP et al.,2009). A angiotensina II se liga ao receptor  $AT_1$ , encontrado em muitos tecidos como o músculo liso vascular, glândulas adrenais, rins e coração, com isso desencadeia várias reações biológicas importantes, incluindo a vasoconstrição e liberação de aldosterona (KATZUNG, B. G., TREVOR, A. J., 2017).

Bloqueando o receptor  $AT_1$  (Figura 2), a losartana impede a ação de vasoconstrição. A ligação da losartana potássica é seletiva ao  $AT_1$  e, portanto, não interage ou bloqueia outros receptores ou canais iônicos atuantes na regulação cardiovascular (MERCK, 2015).

**Figura 2** - Atuação dos bloqueadores do receptor de angiotensina II



Legenda: Bloqueadores do receptor angiotensina II (BRA), Bloqueiam especificamente o receptor  $AT_1$  da angiotensina II impedindo a ação de vasoconstrição.

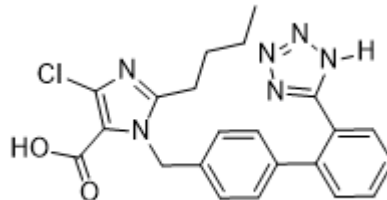
Fonte : a autora

Após a administração oral aproximadamente 14% da dose é convertida em um metabólito ativo de ácido carboxílico (EXP-3174), resultante da oxidação do grupamento 5-metanol do imidazol, representado na Figura 3. Quando administrada



por via oral, 4% da dose de losartana é excretada na sua forma inalterada na urina e 6% na forma de seu metabólito ativo (MERCK, 2015).

**Figura 3** - Estrutura química do metabólito ativo de ácido carboxílico (EXP – 314)



Legenda: 1-((2'-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-2-butyl-4-chloro-1H-imidazole-5-carboxylic acid.

Fonte: MSD, 2012.

### 3.3 Losartana no Ambiente

As principais rotas de entrada dos fármacos no ambiente são por meio da excreção de pacientes e do descarte inapropriado de medicamentos não utilizados ou com prazo de validade expirado nas redes de esgotos (BOUND et al., 2006). Assim que consumidos, tanto a excreção biliar e urinária contribuem para a eliminação da losartana potássica e seus metabólitos, podendo assim atingir matrizes ambientais (VITAMEDIC, 2016). O tratamento convencional, que ocorre nas estações de tratamento remove apenas uma parte dos fármacos, permitindo que o restante possa atingir águas subterrâneas e superficiais. Em ambientes aquáticos, os compostos podem sofrer alterações quantitativas, como a diluição, reconcentração ou transferência de fase, e qualitativas, como os processos de degradação e de diversas reações químicas podendo modificar o seu potencial tóxico (REQUE, 2017).

Dados relacionados à farmacocinética de um medicamento são de fundamental importância para a avaliação do risco ambiental. Dentre os conceitos associados à linha farmacológica encontram-se os valores de Kow (coeficiente de partição octanol-água). A partir destes valores, é possível correlacionar os parâmetros farmacocinéticos de uma molécula, tais como absorção, distribuição,

metabolização e excreção no organismo humano, bem como a propriedade de bioacumulação em organismos aquáticos, contribuindo deste modo para análises ecotoxicológicas. Deste modo, fármacos que apresentam maiores valores de  $K_{ow}$  possuem maior efeito bioacumulativo, aumentando a possibilidade da geração de danos ecotoxicológicos (YAMAMOTO et al., 2012)

Considerando as características físico-químicas da losartana potássica, como sua elevada solubilidade em água e o elevado valor de partição octanol-água, destaca-se o caráter anfótero da substância, sugerindo assim que a losartana potássica apresenta baixo potencial para se ligar ao lodo das estações de tratamento de esgoto e a outros materiais orgânicos, ao mesmo tempo em que seu potencial para ser transportado para corpos de água superficiais e subterrâneos não pode ser descartado. Deve-se considerar também que a losartana potássica é um ácido fraco, o qual não se dissocia completamente seus íons em água (GODOY, 2015).

De acordo com a Agência Americana – FDA (2002), a losartana potássica não sofre hidrólise rápida em pH 5, 7 e 9 e, com relação à fotólise, a meia-vida desse fármaco é de 10, 12 e 18 horas em pH 5, 7 e 9, respectivamente. Porém estes dados não conclusivos para afirmar a possível atenuação das concentrações do fármaco em condições ambientais, sabendo que a fotodegradação em águas superficiais depende da intensidade de luz incidente, a qual varia na dependência das condições geográficas e sazonais (REQUE, 2017). Além disso, a taxa de fotorreação é afetada por sólidos suspensos e dissolvidos, por exemplo, os ácidos húmicos que, por estarem normalmente presentes em concentrações superiores às do composto químico em consideração, absorvem a maior porção da luz solar penetrante nesses ambientes (EUROPEAN UNION, 2003). Existem poucos dados sobre a detecção da losartana potássica em estações de tratamento de efluentes e em águas naturais. Entretanto na Tabela 1 são apresentados alguns dados referentes às concentrações de losartana potássica detectadas no meio ambiente.

**Tabela 1** - Concentrações de losartana detectadas no meio ambiente e em estações de tratamento.

ORIGEM	CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOCAL	FONTE
Área de descarte de efluente em emissário submarino	0,01 a 2,5	Brasil	Guimarães et al. (2012)
Água do mar (região costeira)	0,00118 a 0,0032	Brasil	Pereira et al. (2016)
Afluente de ETE	0,79 a 0,09	Holanda	Oosterhuis et al. (2013)
Efluente de ETE de indústrias farmacêuticas	2400 a 2500	Índia	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)

**Fonte:** a autora

### 3.4 Monitoramento ecotoxicológico

A Ecotoxicologia é uma ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas em organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem em num contexto integrado (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Estudos de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeitos adversos num curto período de tempo, estes estudos frequentemente envolvem, a determinação de dose letal média ( $DL_{50}$ ) ou concentração letal média ( $CL_{50}$ ) (AZEVEDO, CHASIN, 2004). Estudos de toxicidade crônica são realizados observando o animal exposto durante toda ou boa parte da vida. Para determinar o efeito tóxico crônico de uma substância, os animais são expostos por períodos prolongados, estes ensaios visam à determinação da concentração de efeito não observável (CENO), relativo à maior concentração da amostra em que não há efeito tóxico significativo sobre os organismos (AZEVEDO, CHASIN, 2004).

Na tabela 2 constam alguns dados disponíveis na literatura referentes a estudos ecotoxicológicos com a losartana potássica.

**Tabela 1** - Dados ecotoxicológicos da losartana potássica

ORGANISMO	NOME POPULAR	EXPRESSÃO	CONCENTRAÇÃO (mg L <sup>-1</sup> )	FONTE
<i>Daphnia magna</i>	Pulga d'água	CE <sub>50</sub>	331	Yamamoto et al. (2012)
<i>Daphnia similis</i>	Pulga d'água	CE <sub>50</sub>	175,26	Yamamoto et al. (2012)
<i>Lemna minor</i>	Lentilha d'água	CE <sub>50</sub>	63,9	Godoy (2015)
<i>Pimephales promelas</i>	Peixe Vairão	CL <sub>50</sub>	1000	Agência Americana FDA (2002)
<i>Lytechinus variegatus</i>	Ouriço do mar	CENO	50	Yamamoto et al. (2012)
		CEO	70	

Legenda: (CE<sub>50</sub>): Concentração que apresenta efeito em 50% dos organismos testados. (CL<sub>50</sub>): Concentração em que apresenta letalidade em 50% dos organismos testados. (CENO): concentração de efeito não observado. (CEO): Concentração de efeito observado.

Fonte: a autora

Observando os valores da losartana potássica encontrada no ambiente e os valores ecotoxicológicos frente a cada organismo-teste, mostram que as concentrações de losartana consideradas como tóxicas aos organismos nos testes conduzidos são superiores às concentrações detectadas em corpos aquáticos e estação de tratamento. Com o levantamento bibliográfico foi possível observar também que os dados disponíveis não contemplam informações ecotoxicológicas do efeito da losartana potássica sobre o organismo *Desmodesmus subspicatus*.

### 3.5 *Daphnia magna* como organismo-teste

*Daphnia magna* (Figura 4) é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm. Atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material

orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas. São vulgarmente conhecidas como pulgas d'água (KNIE, 2004).

**Figura 4 - *Daphnia magna***



Fonte: Aquarium-kosmos, 2017

É um dos organismos zooplanctônicos mais utilizados em testes ecotoxicológicos em vários países atualmente e reage sensivelmente a uma variedade de agentes tóxicos (ALVES, 2006). Segundo Knie (2004), a escolha de *Daphnia magna* como organismos-teste fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de respostas nos ensaios;
- a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios;
- o manuseio é simples, devido ao tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos;
- a espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos;
- a espécie é adequada para testes estáticos, semiestáticos ou de fluxo contínuo;
- o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar as daphnias em testes crônicos;

- a *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em laboratórios ecotoxicológicos.

### 3.6 *Desmodesmus subspicatus* como organismo-teste

*Desmodesmus subspicatus* (Figura 5) é uma alga verde planctônica, representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. Devido à função de produtoras primárias, as algas são a base da cadeia alimentar aquática, destacam-se pela manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, pois participam dos ciclos biogeoquímicos, especialmente do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício. Na natureza, as microalgas formam agregados de até 5 ou 6 células, ao passo que nos cultivos em laboratório se mostram normalmente unicelulares (KNIE, 2004).

Por sua importância trófica nos ecossistemas aquáticos, pesquisas básicas com algas acontecem há muito tempo. Como indicadora da poluição aquática, são usadas aproximadamente há 100 anos, em geral, as análises com microalgas são utilizadas para avaliação da qualidade hídrica e de efluentes, bem como da periculosidade de substâncias químicas. Os ensaios são baseados na observação dos efeitos desses meios sobre o desenvolvimento da biomassa algal (KNIE, 2004).

**Figura 5** - *Desmodesmus subspicatus*



Fonte: CCALA, 2017

### 3.7 Ensaio Cometa

O ensaio cometa é um ensaio biomarcador genético, sensível e rápido. Permite obter grande quantidade de dados em células individuais, necessita de um número pequeno de células e pode ser realizado com qualquer tipo de célula eucarioto (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Utilizado para a avaliação da genotoxicidade o ensaio cometa, permite a detecção de danos causados ao DNA, em níveis de concentração de contaminantes muito baixos (HARTMANN et al., 2003). O ensaio está baseado na quebra das membranas celulares, seguida pela indução da migração por eletroforese (microeletroforese) do DNA liberado em matriz de agarose. A célula migrada em matriz de agarose, quando vista no microscópio, adquire a forma de um cometa, a qual contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo, presente na cuba eletrolítica, utilizada durante ensaio (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

A genotoxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância interagir com o material genético dos organismos e em alterar sua estrutura e função, induzindo mutações (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Existem vários ensaios que determinam o potencial genotóxico de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (ARENZON; NETO; GERBER, 2011). Dentre os teste mais conhecidos estão o Teste de Ames, Teste de Kado, Micronúcleo e Ensaio Cometa (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O interesse em utilizar o ensaio cometa no monitoramento ambiental surgiu devido as suas vantagens, como a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas (DOMINGOS, 2006). É um ensaio bem difundido na área de ecotoxicologia, mas geralmente é realizado utilizando células de peixes e com isso existem poucos trabalhos empregando *Daphnia magna* como organismo (PARRELLA, et al., 2015 e PARK; CHOI, 2007).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Reagentes

O composto utilizado para os ensaios de ecotoxicidade foi o fármaco losartana potássica (Marca: Delaware, Fabricante: Aurobindo Pharma, Índia, pureza: 99%).

### 4.2 Cultivo de *Daphnia magna*

O cultivo de *Daphnia magna* utilizado para realizar os ensaios de toxicidade aguda e genotoxicidade com losartana potássica foi mantido de acordo com a norma ABNT NBR 12713:2016.

Aproximadamente 60 neonatos foram distribuídos em béqueres de 2000 mL em meio de cultivo (Anexo A) previamente preparado e aerado durante 24 horas, com dureza total de  $250 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$  (analisado com titulação), pH de  $7,8 \pm 2$ , medido em pHmetro (marca: Hanna Instruments; modelo: HI 2221). Os organismos foram mantidos em incubadora tipo BOD (marca: Solab ; modelo: SL- 224) com controle de temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo (16 horas de claridade e 8 horas escuro). O cultivo foi feito no laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR. Os organismos foram alimentados com microalga unicelular *Desmodesmus subspicatus*, que foi cultivada conforme metodologia descrita na ABNT NBR 12648:2011, também mantido no laboratório de Ecotoxicologia, conforme item 4.5.

### 4.3 Testes de Sensibilidade e carta controle de *Daphnia magna*

Todos os procedimentos relativos ao cultivo das daphnias refletem na sua sensibilidade, cuja estabilidade é essencial para a confiabilidade dos resultados dos testes. O teste realizado foi o teste agudo, que detecta o efeito deletério imediatamente, geralmente irreparável. As daphnias utilizadas no teste tinham de 2 à 26h de vida.



Os testes foram realizados conforme a NBR 12713:2016 e os resultados foram determinados através do método estatístico Probitas, com o auxílio do programa estatístico BioStat® e Microsoft Excel®. Nos testes, foi calculada a média da imobilidade para cada concentração utilizada. O resultado da média de imobilidade determinou uma  $CE_{50}$  (concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos-teste) para avaliar a saúde do lote em questão e verificar se é possível a utilização dos filhotes de tal lote em outros testes ecotoxicológicos. A sensibilidade dos organismos cultivados foi controlada através de ensaios rotineiros e a confecção das cartas-controle. Estas foram elaboradas através do método de Probitos com auxílio de software, a partir do resultado de 10 ensaios de sensibilidade onde foram calculados o valor médio de  $CE_{50}$ , o desvio padrão e o coeficiente de variação da sensibilidade dos organismos com relação à substância de referência. A substância de referência empregada no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR é o  $ZnSO_4$  (Sulfato de Zinco) nas seguintes concentrações 0, 5, 20, 35, 50, 65, 80 e 95  $mg L^{-1}$ .

#### **4.4 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna***

A fim de calcular a  $CE_{50}$  (concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos-teste) da losartana potássica, ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com metodologia descrita na NBR 12713:2016. Primeiramente foram feitos estudos de curta duração denominados testes preliminares, testes úteis para uma avaliação preliminar rápida, fornecendo informações limites para o aparecimento de efeitos adversos, toxicidade comparativa e seletiva. Estes testes foram usados para estabelecer as concentrações a serem utilizadas em estudos subsequentes, sendo que as concentrações utilizadas no teste preliminar foram baseadas na concentração efetiva média ( $CE_{50}$ ) encontrada na literatura 331,0  $mgL^{-1}$  (YAMAMOTO et al., 2012).

Determinadas as concentrações limites, posteriormente foram feitos os testes definitivos onde vinte organismos jovens (2-26 h), obtido de fêmeas com idade entre 10 e 60 dias, foram adicionados a 40 mL de soluções de losartana em diferentes concentrações 0, 230, 260, 290, 320, 350 e 380  $mg L^{-1}$ . As soluções foram

preparadas em água de diluição (ANEXO B) e não foram utilizados solventes para solubilizar a substância. Os organismos foram incubados a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48h no escuro. Após o tempo de exposição o número de organismos imóveis por amostra foi observado e a concentração efetiva a 50% dos organismos testados ( $\text{CE}_{50}$ ) foi calculada. Os resultados só foram válidos se a porcentagem de organismos imóveis no controle negativo não ultrapassar os 10% (ABNT, 2016).

#### **4.5 Cultivo de *Desmodesmus subspicatus***

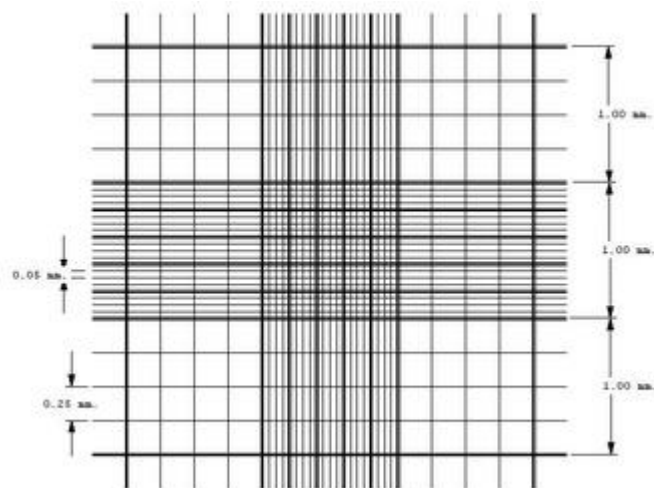
O cultivo de *Desmodesmus subspicatus* utilizado para realizar os ensaios de toxicidade crônica com a losartana potássica foi mantido no laboratório de Ecotoxicologia de acordo com a norma NBR 12648:2011 (ABNT). Esse cultivo foi mantido em meio de cultura CHU (ANEXO C) conforme a norma; em sala de cultivo com temperatura controlada  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

O meio de cultura CHU foi preparado e autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos em erlenmeyer de 1000 mL. Toda a manipulação do meio CHU foi feita em fluxo laminar para evitar contaminações. Os repiques das algas foram realizados para garantir que 3 dias antes do ensaio o inóculo utilizado no ensaio contenha  $10^4$  a  $10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>. A determinação da concentração celular do inóculo de *Desmodesmus subspicatus*, essencial para o desenvolvimento do ensaio, foi obtida, fazendo a contagem celular em câmara de Neubauer.

O método de contagem das células foi feito a partir de uma metodologia citada por Madigan et al. (2009). Onde depois de homogeneizado o material, foi pipetado 20  $\mu\text{L}$  da amostra e adicionado à câmara de Neubauer. Conforme a Figura 6 (Representação da câmara de Neubauer) a câmara contém 9 quadrados grandes, cada quadrado grande contém 16 quadrados médios e na região central da câmara, cada quadrado médio contém 16 quadrados pequenos. Cada quadrado pequeno apresenta uma área de  $0,0025 \text{ mm}^2$  e profundidade de 0,1mm. Com isso nos quadrantes pequenos o volume é  $2,5 \times 10^{-7} \text{ mL}$ ; nos quadrantes médios o volume é  $6,25 \times 10^{-7} \text{ mL}$  e nos quadrantes grandes o volume é  $1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ . A forma de contagem na célula de Neubauer depende da densidade celular nos campos, geralmente para uma alta densidade celular contam-se os quadrados médios da

região central (contando as quatro extremidades e quadrante central fazendo a média entre eles), e para amostra com baixa densidade celular contam-se os quadrantes maiores e faz-se a média entre eles. Na contagem não se levou em consideração as células nas margens superiores e a direita. Com isso após a contagem celular e fazendo as médias de contagem, para células contadas nos quadrantes grandes multiplicasse a média por  $10^4$  e nos quadrantes médios por  $0,16 \times 10^6$ , assim obtém-se a concentração celular por mL ( $\text{cel mL}^{-1}$ ).

**Figura 6** - Representação da câmara de Neubauer



Fonte: Madigan, et al. (2009).

#### 4.6 Teste de toxicidade crônica com *Desmodesmus subspicatus*

Para todos os ensaios com *Desmodesmus subspicatus* o efeito avaliado foi o crescimento algáceo, sendo o tempo de ensaio de 72 horas. O teste foi realizado em luminosidade de 7000 lux medido através de luxímetro e mantido sobre agitação constante a 140 rpm em mesa agitadora orbital “shaker” (marca: Tcnal; modelo: TE – 1400), em ambiente com temperatura controlada entre  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  monitorada por termômetros. O inóculo utilizado para o teste foi uma pré-cultura de 3 dias em meio DIN (ANEXO D), meio foi preparado utilizando 10 mL da solução 1, 1 mL da solução 2 e 1 mL da solução 3 do meio DIN, proporção essa utilizada pra preparar 1 litro de solução pré teste. A pré-cultura deve alcançar a densidade de  $10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ , após 3

dias de incubação.

Todo material utilizado no teste foi autoclavado e os erlenmeyers de 125 mL foram devidamente tampados para evitar a evaporação. Os erlenmeyers foram preenchidos até aproximadamente a metade (70mL), pois durante a incubação eles foram agitados em mesa orbital durante 72 horas.

Para o teste, a solução nutriente (DIN) (ANEXO D) foi preparada a partir da solução estoque, utilizando 100 mL da solução 1, 10 mL da solução 2 e 10 mL da solução 3 do meio DIN, proporção essa utilizada pra preparar 1 litro de solução teste. O pH do meio foi ajustado em  $8,0 \pm 0,5$ , o meio foi autoclavado por  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos e depois de frio, foram adicionados 3 g de bicarbonato de sódio por litro de solução. A cultura durante o teste deve alcançar a densidade de  $10^4$  células.mL<sup>-1</sup>

Primeiramente foi feito o teste de sensibilidade com a *Desmodesmus subspicatus*, utilizando K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (dicromato de potássio) como substância de referência, nas concentrações de 0,08; 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,80 e 0,96 mg L<sup>-1</sup>, a partir do resultado de 10 ensaios de sensibilidade foram calculados o valor médio de inibição de crescimento celular, o desvio padrão e o coeficiente de variação da sensibilidade dos organismos com relação à substância de referência, construindo assim a carta controle parcial. As concentrações escolhidas para realizar o teste de sensibilidade foram escolhidas a partir do valor de CEO<sub>50</sub> (concentração capaz de causar 50% de inibição do crescimento algal) encontrado na literatura 0,53 mg L<sup>-1</sup> (KNIE, 2014).

O teste com a losartana potássica foi feito em triplicata e foram utilizadas diferentes soluções em diferentes concentrações 0,23, 26, 29, 32, 35 e 38 mg L<sup>-1</sup>. Essas concentrações foram escolhidas, baseadas nas utilizadas no ensaio com *Daphnia magna*. O teste preliminar foi feito a partir das concentrações utilizadas para o teste com a *Daphnia magna*, posteriormente foram baixando as concentrações e repetindo os testes até encontrar as concentrações onde poderia encontrar as concentrações que causam efeito para a *Desmodesmus subspicatus*.

Os erlenmeyers com as soluções foram distribuídos de forma aleatória no shaker para minimizar eventuais diferenças espaciais de luminosidade e temperatura. Todos os recipientes foram bem vedados.

Nos testes de toxicidade crônica com *Desmodesmus subspicatus* foi determinada a inibição do crescimento algáceo medido pela diferença de células inicial e final em relação aos valores médios do branco, conforme a (Equação 1). As

medidas foram realizadas no início do teste e após 72 horas. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer.

$$IC = \frac{Mc - Ma}{Mc} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde, **IC**: é a percentagem de inibição da multiplicação das células algáceas;

**Ma**: é a medida do número de células das soluções-teste;

**Mc**: é a média do número de células do controle.

#### 4.7 Ensaio cometa com *Daphnia magna*.

Neste ensaio são utilizadas concentrações subletais para a exposição dos organismos. A toxicidade subletal, de forma geral, avalia os efeitos causados pela substância ou contaminante em um estágio de tempo que não exceda 10% do ciclo de vida do organismo (RAMSDORF, 2011). As concentrações utilizadas para a exposição da *Daphnia magna*, neste ensaio foram 0; 200; 2,5 e 0,25 mg L<sup>-1</sup>, concentrações escolhidas por se tratarem de a maior concentração encontrada, onde não ouve mortalidade para a *Daphnia magna*; concentração de losartana potássica encontrada em Estações de Tratamento (Larsson, Pedro e Paxeus (2007) e concentração de losartana potássica 10 vezes menor a encontrada nas Estações de Tratamento de Efluentes, respectivamente.

Os organismos foram incubados a 20±2°C por 48h no escuro. A metodologia seguida para realizar este ensaio foi primeiramente descrita por Singh et al. (1988), com algumas alterações realizadas para análise de danos ao DNA de *Daphnia magna* (PARRELLA, et al., 2015 e PARK; CHOI, 2007). As lâminas destinadas para receber o material genético dos organismos, foram primeiramente preparadas, mergulhadas em agarose normal 1,5%, liquefeita, e deixadas secar em temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas. A suspensão celular das daphnias foi obtida após a homogeneização, em um homogeneizador rotativo de tecidos (marca:Ultra Stirrer; modelo: Ultra 80), de 40 organismos em 200 µL tampão PBS (pH 7,4) em microtubos de centrifugação. Em microtubos (eppendorf) limpos, foram adicionados 80 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,05% e 30 µL de suspensão celular, proveniente dos organismos desagregados. A suspensão foi

adicionada sobre as lâminas previamente cobertas com agarose normal, e recobertas com uma lamínula e acondicionadas na geladeira por 20 minutos. Para cada concentração testada, foram obtidas 6 lâminas para análise. Em sequência, as lamínulas foram removidas e as lâminas mantidas em uma solução de lise ( $2.5 \text{ molL}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$  e  $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris}$ ) em uma cubeta, por no mínimo 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ , para remoção dos conteúdos celulares e exposição do material genético. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e imersas em uma solução tampão de eletroforese ( $\text{NaOH } 300 \text{ mmolL}^{-1}$  e  $\text{EDTA } 200 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (pH maior que 13), ficando em repouso nesta solução por 25 minutos e, em seguida, foi realizada a corrida eletroforética por 25 minutos, a 25 V e 300 mA, para migração do DNA (SINGH et al., 1988). Todo esse procedimento foi realizado na ausência de luz. Após eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de solução de Tris (pH 7,5), com intervalos de 5 minutos e fixadas em etanol por 5 minutos e guardadas para posterior análise (KNAPIK, 2017).

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência LEICA DMLS, com aumento de 400x; 20  $\mu\text{l}$  de corante brometo de etídeo foi adicionado sobre as lâminas que foram analisadas, no ensaio realizado foram avaliadas 6 lâminas por concentração de exposição. A quantificação dos danos foi realizada visualmente, com a análise de 100 nucleóides por lâmina, de acordo com as classes variando entre 0 (sem dano aparente) a 3 (DNA danificado), adaptado de Parrella et al. (2015). Para determinação dos danos, considerou-se a intensidade de fragmentação da cauda. Após análise dos danos, para cada lâmina, foi atribuído um escore para cada lâmina. O escore foi calculado através do somatório do número de nucleóides com o dano vezes o valor do dano conforme a (Equação 2) (COLLINS et al., 1997).

$$\text{Escore} = (n \text{ classe } 0 \times 0) + (n \text{ classe } 1 \times 1) + (n \text{ classe } 2 \times 2) + (n \text{ classe } 3 \times 3) \quad (\text{Equação 2})$$

onde: n classe = total de danos classificados como 0, 1, 2 ou 3.

Após a análise dos escores foi aplicado o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças significativas entre os grupos analisados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de sensibilidade *Daphnia magna* e carta controle

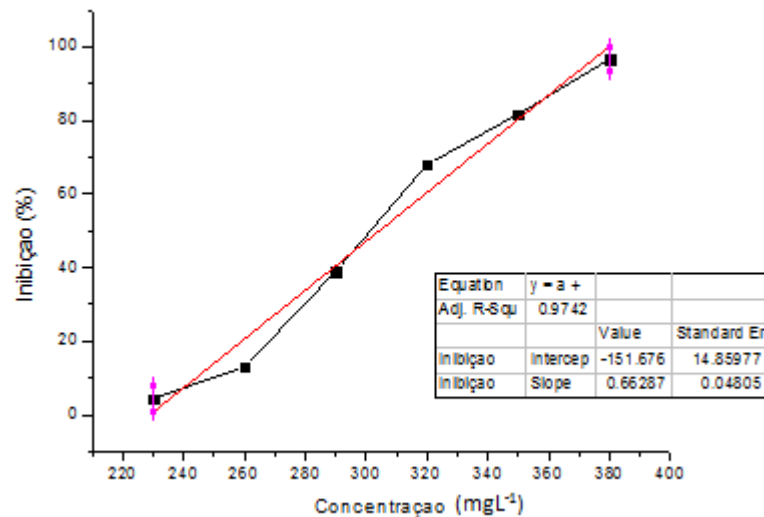
O teste de sensibilidade é utilizado para medir os efeitos das influências externas a organismos-teste e suas condições de vida no laboratório. A sensibilidade indica a estabilidade nos procedimentos de cultivo de *Daphnia magna*, garantindo, assim, a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos testes ecotoxicológicos (KNIE, 2014). Ao final do tempo de exposição, foram registrados os organismos imóveis em cada solução-teste e no controle. Foram considerados imóveis os organismos aparentemente mortos, os que estavam flutuando na superfície e aqueles incapazes de nadar na coluna d'água até 15 segundos após leve agitação do béquer (KNIE, 2014). A média de imobilidade dos organismos foi calculada para cada concentração com o auxílio do programa Microsoft Excel® e estes valores foram avaliados pelo método Probitas no programa estatístico BioStat®, chegando-se em um resultado de  $CE_{50} = 38,4890 \pm 2,1241 \text{ mg L}^{-1}$ , comparando com o valor encontrado na literatura de  $CE_{50}$  para a *Daphnia magna* frente a substância de referência, sulfato de zinco  $43,0 \text{ mg L}^{-1}$  (FISPQ 445, 2008), foram muito próximos, com erro relativo de apenas 10,51%, indicando a reprodutibilidade do ensaio e confirmando o valor da  $CE_{50}$  esperada para o sulfato de zinco. Após 10 ensaios de sensibilidade foi construída a carta controle parcial representada no (APÊNDICE A) onde foram calculados o valor médio de  $CE_{50}$ , o desvio padrão e o coeficiente de variação da sensibilidade dos organismos com relação à substância de referência.

### 5.2 Toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Para as concentrações de losartana potássica aplicadas, e utilizando os resultados obtidos nos ensaios, através do método estatístico Probitas, com o auxílio do programa estatístico BioStat®, Microsoft Excel® e OriginPro8®, representado pela Figura 7, foi possível obter o valor de  $CE_{50}$  de  $303,69 \pm 16,38 \text{ mg L}^{-1}$ . O estudo demonstrou que o losartana potássica em exposição aguda em *Daphnia magna* apresentou toxicidade significativa. O valor encontrado de  $CE_{50}$  no estudo  $303,69 \text{ mg}$

$L^{-1}$  comparado ao apresentado na literatura  $331,00 \text{ mg L}^{-1}$  (YAMAMOTO et al., 2012), foram muito próximos, com erro relativo de apenas 13,65%, indicando a reprodutibilidade do ensaio e confirmando o valor da  $CE_{50}$  esperada para o fármaco.

**Figura 7** – Índices de imobilidade da *Daphnia magna* após a exposição aguda a losartana potássica



Fonte: a autora

### 5.3 Teste de sensibilidade *Desmodesmus subspicatus* e carta controle

Os ensaios de sensibilidade com a *Desmodesmus subspicatus* foram realizados com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) como substância de referência, para posterior cálculo da  $CEO_{50}$  (concentração de efeito observado mediano, concentração que promoveu inibição de 50% do crescimento algal). Este ensaio demonstra a estabilidade e a saúde dos lotes, bem como a viabilidade na utilização da alga em testes ecotoxicológicos.

O teste de sensibilidade é utilizado para medir os efeitos das influências externas a organismos-teste e suas condições de vida no laboratório. A sensibilidade indica a estabilidade nos procedimentos de cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus*, garantindo, assim, a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos testes ecotoxicológicos.

Após 10 ensaios de sensibilidade realizados e obteve-se a carta controle parcial representada no APÊNDICE B. Os resultados obtidos indicaram que a



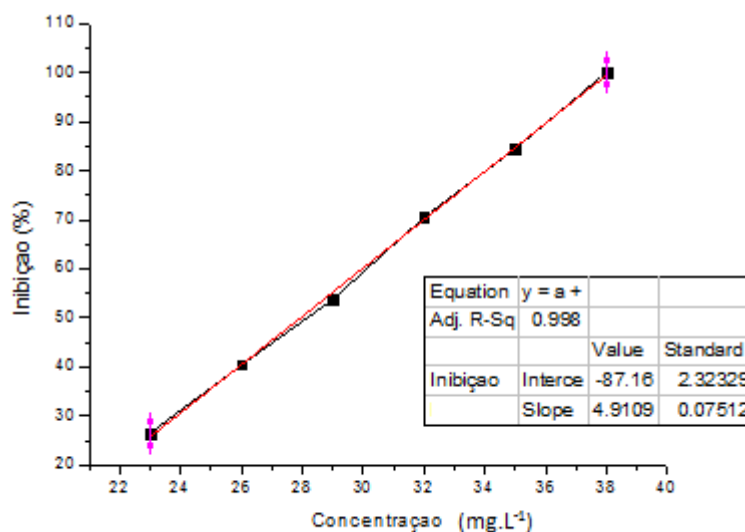
concentração de dicromato de potássio capaz de causar 50% de inibição do crescimento algal ( $CEO_{50}$ ) obtida foi de  $0,54 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ , indicando que o dicromato de potássio mostrou-se tóxico para as microalgas.

Comparando o valor encontrado durante os ensaios  $0,54 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e valor encontrado na literatura da  $CEO_{50}$  para *Desmodesmus subspicatus*  $0,53 \text{ mg L}^{-1}$  (KNIE, 2014), consideram-se os valores muito próximos com desvio padrão percentual de apenas 2,38%. Isto indica a reprodutibilidade do ensaio e confirmando o valor de  $CEO_{50}$  esperada para a substância.

#### 5.4 Toxicidade crônica para *Desmodesmus subspicatus*

Para os estudos avaliando a exposição crônica da losartana potássica frente à microalga *Desmodesmus subspicatus*, utilizando os resultados obtidos nos ensaios, com o auxílio do programa estatístico BioStat®, Microsoft Excel® e OriginPro8®, como representado pela Figura 8, foi possível obter o valor de  $CEO_{50}$  de  $27,9308 \pm 0,0751 \text{ mg L}^{-1}$ . O ensaio indicou que a losartana potássica mostrou-se tóxica para a microalga, porém não foram encontrados valores de  $CEO_{50}$  na literatura a fim de comparação.

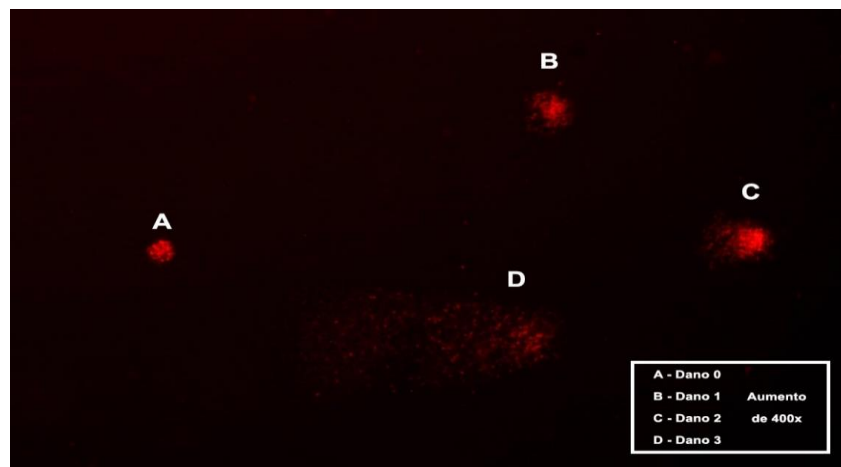
**Figura 8** - Índices de inibição do crescimento da microalga *Desmodesmus subspicatus* após exposição crônica a losartana potássica.



### 5.5 Ensaio cometa com *Daphnia magna*

Após a exposição dos organismos às concentrações 0; 0,25; 2,5 e 200 mg L<sup>-1</sup> de losartana potássica, foram utilizadas daphnias inteiras (homogeneizadas). Após a preparação das lâminas com o material genético dos organismos, os danos (Figuras 9) foram determinados perante a intensidade de material fragmentado que migrou durante a eletroforese (PARRELLA et al., 2015).

**Figura 9** - Classificação visual dos danos (0-3) no material genético de *Daphnia magna*



Legenda: A – sem danos aparentes, B – poucos danos, C – danos intermediários e D – DNA danificado. Fonte: Knapik, 2017.

Após a análise dos danos, foi atribuído um escore para cada lâmina. Com o cálculo dos escores, foi obtida a mediana de cada grupo exposto representados na tabela 3.

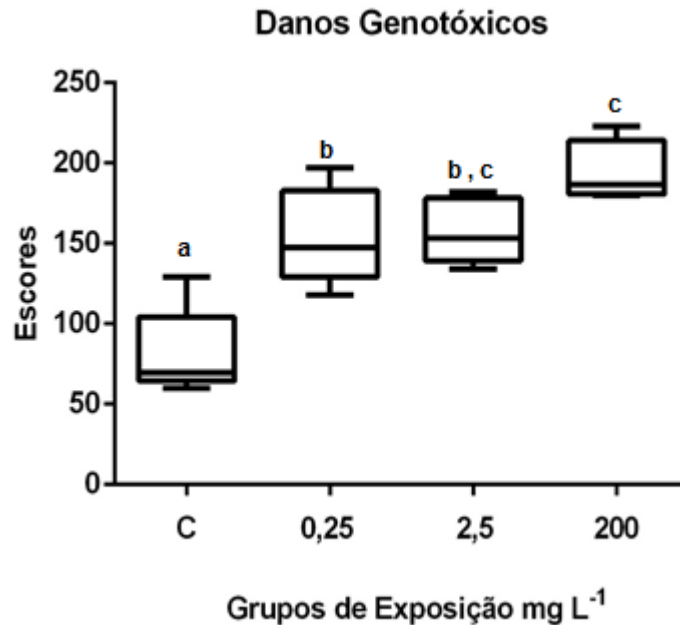
**Tabela 3** - Medianas obtidas a partir dos escores de cada dano.

Grupos	Medianas
Controle	69,50
0,25 mg.L <sup>-1</sup>	147,50
2,5 mg.L <sup>-1</sup>	153,50
200 mg.L <sup>-1</sup>	186,50

A partir das medianas dos escores obtidas, foi construído o gráfico representado pela Figura 10. Este relaciona a mediana dos escores e a concentração dos grupos. Após feito o Teste estatístico Kruskal-Wallis pode-se

perceber que para esta metodologia, houve diferenças significativas entre o controle e as concentrações expostas e nota-se semelhante estatística entre os grupos 0,25 mg L<sup>-1</sup> e a 2,5 mg L<sup>-1</sup> e entre 2,5 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 10** - Gráfico box-plot dos resultados do Ensaio Cometa em *Daphnia magna*



Legenda: Letras iguais indicam falta de diferença estatística significativa e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa após o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Observou-se com este estudo que mesmo em concentrações baixas, a losartana potássica apresentou capacidade de promover danos genotóxicos nas células de *Daphnia magna*. Comparando o presente trabalho com um estudo realizado por Reque, 2017 utilizando o mesmo ensaio biomarcador, ensaio cometa, porém utilizando *Astyanax altiparanae* (lambari) como organismo teste, na concentração de exposição 2,5 mg L<sup>-1</sup> de losartana potássica em tempos de exposição diferentes (6, 12, 24 e 48 h), os grupos expostos apresentaram escores de danos de DNA inferiores aos dos seus respectivos grupos controle, não apresentando assim danos genotóxicos nas células de *Astyanax altiparanae*; porém em uma segunda etapa do estudo, utilizando losartana potássica nas concentrações 0,25 mg L<sup>-1</sup> e 2,5 mg L<sup>-1</sup>, em tempos de 24 e 96 h de exposição. No ensaio cometa, foram verificados escores de danos de DNA reduzidos em relação aos grupos controle, especialmente no tempo de exposição 12 h. Podendo-se sugerir a

formação de *crosslinks* do medicamento. A relação entre o tempo e os efeitos observados não pôde ser totalmente definida, porém, os resultados demonstram que os biomarcadores tenderam a ser afetados a partir de 12 horas de exposição do organismo a losartana potássica.

Notando-se, portanto, que mesmo em concentrações reduzidas, e organismos testes distintos a losartana potássica pode apresentar efeitos genotóxicos e biomarcadores bioquímicos em organismos presentes em corpos aquáticos, destacando a importância de investigar o efeito ecotoxicológico dessa substância.

## 6. CONCLUSÃO

Através da execução deste trabalho, pode-se concluir que organismos como *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus* apresentaram sensibilidade na exposição aguda e crônica a losartana potássica em concentrações na ordem de miligramas por litro do contaminante, tornando possível o cálculo da  $CE_{50}$  e  $CEO_{50}$  para estes dois organismos, a *D. magna* apresentou uma  $CE_{50}$  de  $303,69 \pm 16,38$  mg L<sup>-1</sup> e *D. subspicatus* apresentou uma  $CEO_{50}$  de  $27,9308 \pm 0,0751$  mg L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos estão de acordo com resultados encontrados na literatura para o organismo teste *D. magna*, sendo que para a *Desmodesmus subspicatus* valores de  $CEO_{50}$  não foram encontrados, destacando assim o pioneirismo do ensaio.

Com relação aos estudos feitos a partir da genotoxicidade com a *Daphnia magna* foi possível verificar que nas concentrações estudadas apresentaram genotoxicidade frente à losartana potássica. Com isso ressalta-se a importância da realização do ensaio genotoxicológico no monitoramento ambiental, como a detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas.

Com os ensaios realizados obtiveram-se dados que auxiliaram na compreensão dos efeitos deste fármaco nos organismos de ambientes aquáticos naturais, evidenciando a toxicidade significativa frente aos organismos-testes empregados e destacando a importância de estudos que investiguem os efeitos adversos de substâncias químicas nos ambientes naturais.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos na realização deste trabalho, assim como o conhecimento adquirido no desenvolvimento do estudo, podem-se sugerir os seguintes trabalhos a serem desenvolvidos.

- Realizar ensaios de ecotoxicidade para outros organismos-teste, para verificar os impactos do fármaco em outros níveis tróficos;
- Realizar teste de genotoxicidade com *Daphnia magna* utilizando concentrações mais baixas de losartana potássica;
- Avaliar outros biomarcadores, utilizando a *Daphnia magna* como organismo-teste.

## REFERÊNCIAS

ALVES, A. C.; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustácea) ao dicromato de potássio, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 65, p. 59-61, 2006.

ALVIM, Mariana. Saiba quais foram os remédios mais vendidos no Brasil em 2015. **Lauro Jardim**, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://blogs.oglobo.globo.com/lauro-jardim/post/saiba-quais-foram-os-remedios-mais-vendidos-no-brasil-em-2015.html>>. Acesso em: 23 mai 2017.

AQUARIUM- KOSMOS, *Daphnia magna*, 2017, Disponível em: <http://aquarium-kosmos.de.cutestat.com/> Acesso em 25 mai 2017.

ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. Manual de toxicidade em efluentes industriais. **Conselho do Meio Ambiente**. Rio Grande do Sul. 2011  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR 12713. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR 12713. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR 12648. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica- Método de ensaio com algas (Clorophyceae)**. Rio de Janeiro, 2011.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Editora Rima (Interfox), 2004.

BECK, C. C., LOPES, A. da S., JUNIOR, J. C. de F., BORGATTO, A. F. **Pressão arterial e fatores associados em adolescentes na região Sul do Brasil**. Revista Brasileira de Hipertensão. vol. 23(1):22, 2016.

BILA, D. M., DEZZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente**. Química Nova, vol 26, nº4, 523-530, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21945-970 Rio de Janeiro – RJ, 2003.

BOUND, J.P.; KITSOU, K.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 301-307, 2006. Acesso em: 27 mai. 2017.

BONFILIO, R., FAVORETTO, L. B., PEREIRA, G. R., AZEVEDO, R. C. P., ARAUJO, M. B. **Comparative study of analytical methods by direct and first-derivative UV spectrophotometry for evaluation of losartan potassium in capsules**, Braz. J. Pharm. Sci. vol.46, nº1, São Paulo Jan./Mar. 2010.

BRIANEZI, G. S.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do Cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. McGrawHill, 2012.

COLLINS A., DUSINSKÁ M., FRANKLIN M., SOMOROVSKÁ M., PETROVSKÁ H., DUTHIE S., FILLION L., PANAYIOTIDIS M., RASLOVÁ K., VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol. 30 (2), P139–146, 1997.

CONAMA, BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011**. “Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Acesso em: 23 mai. 2017.

CCALA, Culture Collection of Autotrophic Organism, **R. Chodat E. Hegewald et A. Schmidt**, 2017. Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>>. Acesso em: 25 mai 2017.

DAMAS, L.V. de O.; NASCIMENTO, M. de A.; SOBRINHO, C. L. N. **Prevalência de hipertensão e fatores associados em usuários do Programa Saúde da Família de um município do Nordeste brasileiro**. Revista Brasileira de Hipertensão vol. 23(2):39-46, 2016.

DELUCIA, Roberto. **Farmacologia integrada, Uso racional de medicamentos**. 5 ed. São Paulo- SP, 2016, pg 343.



DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006, 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006

EUROPEAN UNION. European Commission. JRC Technical Report. **Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards**. Directive 2008/105/EC, as amended by Directive 2013/39/EU, in the field of water policy Directive, 2015. Disponível em: <<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC95018/lbna27142enn.pdf>>. Acesso em: 23 mai. 2017.

FERREIRA, Juliano C. R. **Remoção de Micropoluentes Emergentes em Efluentes Sanitários Através de Carvão Ativado**. 2011. 162 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente Urbano e Industrial) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FISPQ – Ficha de informações de Segurança e Produtos Químicos, nº 445, Labsynth, 2008.

GIOLLO-JUNIOR, Luiz T.; COSENSO-MARTIN, Luciana N.; PAIVA, Anelise M.; MOTA-GOMES, Marco A.; VILELA-MARTIN, José F. A avaliação da resposta anti-hipertensiva na otimização da rigidez arterial e pressão central. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 21., n. 1, p. 18 - 23, 2014.

GODOY, A. A., KUMMROW, F., PAMPLIN, P. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride na losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. **Springer Science Bussines Media New York**, 2015.

GUIMARÃES, L.L. et al. Determinação de fármacos na área de influência do emissário submarino de Santos-SP. In: **Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 12., 2012, Porto de Galinhas-PE. Disponível em: <[http://www.infoteca.inf.br/ecotox/smarty/templates/arquivos\\_template/upload\\_arquivos/acer vo/docs/199.pdf](http://www.infoteca.inf.br/ecotox/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/acer%20vo/docs/199.pdf)>. Acesso em: 11 out. 2017.

HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E.; MOLINOFF, Perry B; RUDDON, Raymond W.; GILMAN, Alfred G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9 ed. México: Gooman & Gilman, McGraw-Hill, 1996.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, n. 18, p. 45- 51, 2003.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J., **Farmacologia básica e clínica**. 13ª edição, editora Atmed, Porto Alegre, 2017.

KNAPIK, L. F. O.; RAMSDORF, W. **Genotoxicidade do inseticida Malathion em *Daphnia magna***. 2017. Trabalho apresentado (Encontro Nacional de Química Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

KNIE, Joachim L. W.; LOPES, Ester W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis (SC): FATMA/GTZ, 2004.

LARSSON, Joakim; PEDRO, Cecilia; PAXEUS, Niklas. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p.751 - 755, 2007.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.M., DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Editora Artmed, 2009. ISBN 8536323302, 978853632330.

MERCK. **Losartana Potássica**. Rio de Janeiro, 2015.

MSD. **Coozar**: losartana potássica. Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2012. <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7960152015&pIdAnexo=2837802](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7960152015&pIdAnexo=2837802)>. Acesso em: 23 mai. 2017.

OLIVEIRA, Joseane M.; AREND, Clarissa O.; GERBER, Wagner D. Dossiê Técnico: **Toxicidade em efluentes industriais**. SENAI-RS, Centro Nacional de Tecnologias Limpas, 2011.

OLIVEIRA, Vagne M.; ASSIS, Caio R.; SILVA, Raquel P.; BEZERRA, Ranilson S. Efeitos do FeCl<sub>2</sub> e CuCl<sub>2</sub> na atividade da acetilcolinesterase cerebral de *Oreochromis niloticus*. **Natural Resources**, v. 2, n. 2, p. 27 - 36, 2013.

OOSTERHUIS, M; SACHER, F.; TER LAAK, T. L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Science of the Total Environment**., v. 442, p. 380 - 388, 2013

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; RUSSO, C.; ISIDORI, M. Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**. v. 286, p. 573-580, 2015.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**. V. 33, p. 817-822, 2007.

PEREIRA, C. D. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**. p. 148 -154, 2016.

PRÓGENÉRICOS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS. 2013. “**Saiba quais são os genéricos mais vendidos no País**”. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/index.php/noticias/326-qsaiiba-quais-sao-os-genericos-mais-vendidos-no-paisq>>. Acesso em: 24 mai. 2017.

RAMSDORF, W. **Avaliação da Toxicidade dos compostos Fipronil, Nitrato de Chumbo e Naftaleno em Peixes**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

REQUE, Regiane. **Avaliação da Ecotoxicidade de Losartana Potássica em *Astyanax altiparanae* (lambari) através de ensaio cometa e biomarcadores bioquímicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SANTOS, Lúcia H.M.L.M.; ARAÚJO, A.N.; FACHINI, Adriano; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45 - 95, 2010.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

TRAP, S.M., VAILATTI, M.C.F, MATSUBARA, B.B., SCHWARTZ, D.S. **Effects of angiotensin II in the vascular system**. Archives of Veterinary, v.14, n.4, p.233-243, ISSN 1517-784X, 2009.

United States of America-FDA. **Review of environmental assessment of Coozar tablets.**, 2002.

VICENTE, Gustavo H. L. **Desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação dos fármacos Diclofenaco, Nimesulida e Paracetamol em águas superficiais da cidade de São Carlos - SP.** 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

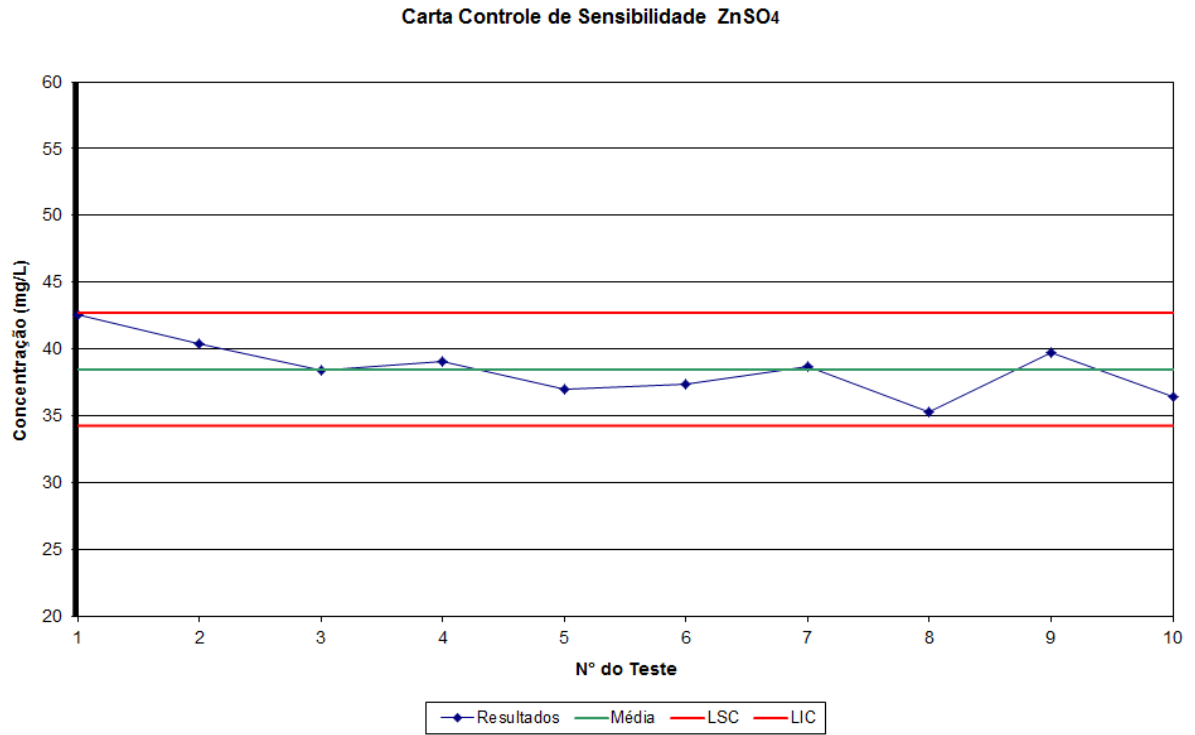
VITAMEDIC INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA., **Bula da losartana potássica 50mg**, Anápolis- Goiânia, 2016.

YAMAMOTO, Nathália S. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos anti-hipertensivos losartan e valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea).** 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas Costeiros e Marinheiros) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2014.

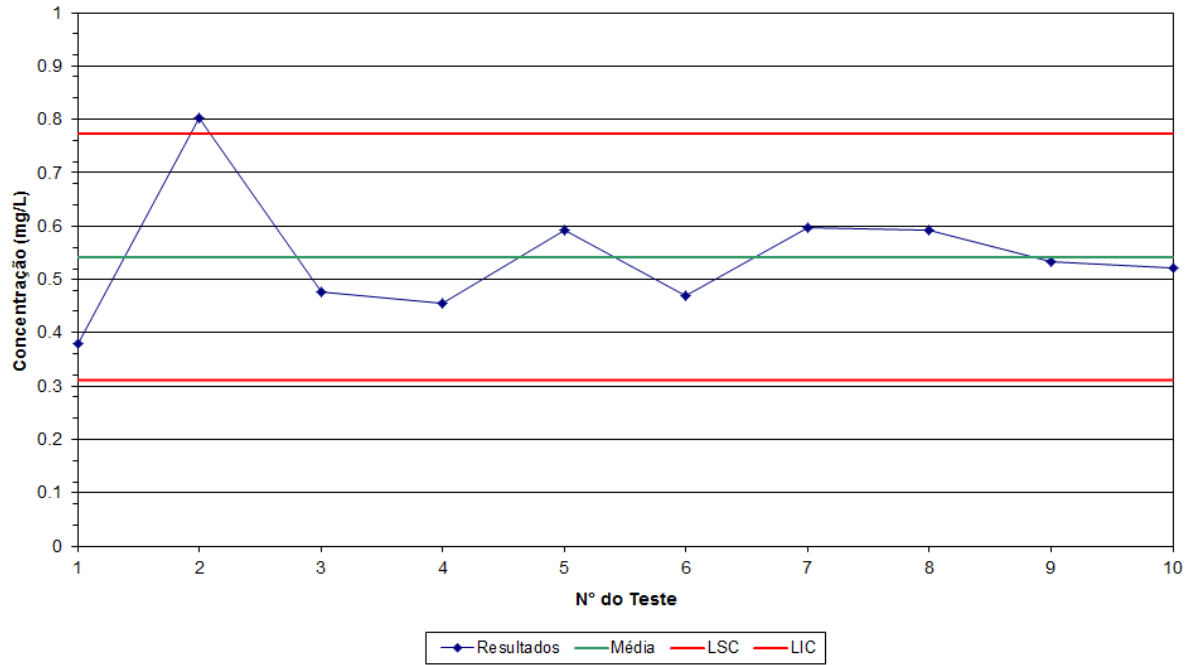
ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLETTI, Eduardo. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2008.

## APÊNDICE A

Carta controle de Sensibilidade de *Daphnia magna* ao Sulfato de Zinco.



Legenda: LSC: Limite superior de controle; LIC: Limite inferior de controle.

**APÊNDICE B**Carta controle de Sensibilidade de *Desmodesmus subspicatus* ao Dicromato de PotássioCarta Controle de Sensibilidade  $K_2Cr_2O_7$ 

Legenda: LSC: Limite superior de controle; LIC: Limite inferior de controle.

## ANEXO A

Soluções utilizadas no meio de cultivo da *Daphnia magna*.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123300	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
3	KCl	5800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
4	NaHCO <sub>3</sub>	64800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
5	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7210	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
	LiCl	6120	
	RbCl	1420	
	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3040	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	335	
	ZnCl <sub>2</sub>	260	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200	
6	NaNO <sub>3</sub>	548	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5719	
	NaBr	32	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	126	
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1,15	
	KI	6,5	
7	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	4,38	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada, deixando em agitação até o clareamento da solução.
	NaSiO <sub>3</sub>	21465	
8	Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O	500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água destilada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C por 15 min
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	199,1	
9	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368	
	Hidrocloreto de tiamina	750	
10	Cianocobalamina (vitamina B12)	10	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada. Congelar em volume adequado para uso
	D (+) Biotina	7,5	

Adaptado da ABNT NBR 12713:2016.

**ANEXO B**

Composição da água de diluição

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução 1 do meio de cultivo da <i>Daphnia magna</i>	3,2 mL para 1000 mL de solução
Solução 2 do meio de cultivo da <i>Daphnia magna</i>	0,8 mL para 1000 mL de solução
Solução 3 do meio de cultivo da <i>Daphnia magna</i>	0,8 mL para 1000 mL de solução
Solução 4 do meio de cultivo da <i>Daphnia magna</i>	0,8 mL para 1000 mL de solução

Adaptado da ABNT NBR 12713:2016.



### ANEXO C

Soluções utilizadas no meio de cultivo CHU da *Desmodemus subspicatus*.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	NaNO <sub>3</sub>	25000	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
6	NaCl	2500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
7	Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O KOH	50000 31000	Dissolver, acrescentar 1 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% e completar para 1000 mL com água destilada.
8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4980	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11420	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
10	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	88,2	Dissolver e diluir a 1000 mL com água destilada.
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	14,4	
	MoO <sub>3</sub>	7,1	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	15,7	
	Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O	4,9	

Adaptado da ABNT NBR 12648:2011.

## ANEXO D

Soluções utilizadas no meio de cultivo DIN da *Desmodemus subspicatus*.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	NH <sub>4</sub> Cl	1500	Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada.
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1200	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1800	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1500	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	160	
2	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	80	Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada.
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	100	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185	Solução 3.1
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	415	Dissolver e completar para 500 mL com água destilada.
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7	
	ZnCl <sub>2</sub>	30	Solução 3.2
			Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada.
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	15	Solução 3.3
			Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada.
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10	Solução 3.4
			Dissolver e completar para 1000 mL com água destilada.

Adaptado da ABNT NBR 12648:2011.