

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

**ELIANE ADAMS**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE  
LOSARTANA POTÁSSICA APÓS FOTÓLISE UVC E PROCESSO  
UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**CURITIBA  
2019**

**ELIANE ADAMS**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE  
LOSARTANA POTÁSSICA APÓS FOTÓLISE UVC E PROCESSO  
UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriane Martins de Freitas

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

CURITIBA  
2019

**ELIANE ADAMS**

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE  
LOSARTANA POTÁSSICA APÓS FOTÓLISE UVC E PROCESSO  
UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Curitiba. Após deliberação, a banca examinadora composta pelos membros a seguir considerou o trabalho aprovado:

---

Profa. Dra. Cíntia Mara Ribas de Oliveira  
UP

---

Profa. Dra. Claudia Regina Xavier  
UTFPR-CT

---

Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas (orientadora)  
UTFPR-CT

---

Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins (coorientadora)  
UTFPR-CT

---

Prof. Dr. Luiz Marcos de Lira Faria  
(coordenador de curso)

Curitiba, 04 de julho de 2019.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço Àquele que esteve presente em todas as etapas, seja através de pessoas, palavras, momentos, oportunidades e que sempre guiou meu caminho. Àquele que nunca me desamparou, ouviu minhas preces e as realizou da melhor forma possível. A Deus toda honra e toda a glória, agora e para sempre.

Agradeço aos meus pais, Célia e Divonzir, e à minha irmã, Cristiane, por todo o amor, zelo, carinho, apoio, por serem os melhores pais e a melhor irmã que alguém poderia ter. Meu amor por vocês é infinito.

Agradeço às minhas orientadoras, Wanessa e Adriane, pela oportunidade de iniciação científica, por toda a paciência e ajuda durante todos esses anos, admiro muito vocês como profissionais e pessoas. A Ecotoxicologia é a área que eu amo e agradeço a Deus por desde o começo da graduação ter me mostrado isso.

Agradeço ao laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) pela disponibilização da leitora de microplacas, cromatógrafo líquido de alta eficiência e microscópio de epifluorescência, que foram equipamentos imprescindíveis para execução do trabalho. Agradeço à minha coorientadora, Lucia, e ao professor Marcus Liz por todas as contribuições desde o projeto até o término deste TCC.

Agradeço aos meus gestores do ISI-EQ, Berton e Leandro, pela oportunidade de estágio e que foi, sem dúvidas, a melhor experiência que eu poderia ter fora da universidade. À Gabriela e ao Cyrille, por toda a paciência e disponibilidade em me ensinar e ajudar com todas as técnicas necessárias para a execução do estágio. Agradeço também toda a equipe ISI-EQ, em especial ao Glauco, Bárbara, Bia e Fran.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Ecotoxicologia: Samuel, Rhai, Regi, Ju, Moni, Vini, Cami, Luis, Yorrannys Mannes, Duda, Fer, Renan, vocês são incríveis, obrigado por todo o apoio, por todas as conversas e risadas, por dividirem comigo o que sabiam e, para alguns, deixar que eu compartilhasse o que aprendi durante estes anos.

Agradeço às minhas colegas do GPTec: Rubia e Suelen, por tirarem um pouco do seu tempo para me ajudar sempre quando foi preciso.

Agradeço às minhas amigas de longa data Paola, Jéssica, Letícia e Ana Paula, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida, inclusive desta, e sei que estarão nas que virão.

Agradeço aos meus amigos de curso: Lucas Prado, Lucas Lacerda, Julie, Dani, Ju, Day, Mayara, Juliano, Márcia, Eiji, Eduardo por todos os seminários, relatórios, conversas, risadas, desabafos. À Thays, minha amiga querida com quem eu compartilhei muitos momentos de alegria, sua amizade é uma dádiva da UTF que levarei para a vida inteira. À Natalha, por me acompanhar desde a PUCPR e por ser uma amiga incomparável. À Parol, que compartilhou comigo todos os momentos desta jornada, sejam felizes ou tristes. À Fernanda, minha equipe, por todos os seminários e relatórios (que foram muitos), admiro muito a sua dedicação e perseverança em tudo o que faz, é um exemplo de amiga e profissional. Ao Bruno Neves, por me ajudar desde o começo do curso com as físicas e cálculos e, no final da graduação, com a análise cromatográfica. Se a graduação foi um pouco mais leve e muito divertida, foi graças a todos vocês. Eu agradeço a Deus pela vida de cada um e por serem essas pessoas sensacionais.

Agradeço toda minha família, especialmente meu tio Edson (*in memoriam*), e todos que me incentivaram e me ajudaram, de alguma forma, para que este sonho se tornasse possível.

Agradeço a UTFPR, pelo apoio financeiro e por prover a estrutura necessária para minha formação profissional. Sinto-me orgulhosa por ter sido discente desta instituição.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

ADAMS, Eliane. **Avaliação da ecotoxicidade e genotoxicidade de losartana potássica após fotólise UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

A losartana potássica é um fármaco pertencente à classe de hipertensivos inibidores do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II, evitando a vasoconstrição e a elevação da pressão arterial. É amplamente empregado no tratamento da hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, sendo o anti-hipertensivo mais consumido no Brasil. A ineficiência dos métodos convencionais de tratamento de efluentes na remoção de contaminantes emergentes, contribui com o aporte de fármacos como a losartana potássica e seu metabólito ácido carboxílico ativo, em corpos hídricos receptores, sendo encontradas concentrações de losartana potássica de 0,295 ng L<sup>-1</sup> a 2,5 mg L<sup>-1</sup> no ambiente, o que faz necessário o estudo e aplicação de técnicas complementares para remoção deste xenobiótico. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a degradação, a ecotoxicidade e a genotoxicidade do fármaco losartana potássica (2,5 mg L<sup>-1</sup>) após tratamento por fotólise (radiação UVC) e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para tanto, foram realizados ensaios agudos utilizando *Daphnia magna* (NBR 12713:2016) e ensaios crônicos com *Desmodesmus subspicatus* (NBR 12648:2018). Para avaliação da genotoxicidade, realizou-se o ensaio cometa com células de *Daphnia magna*, através da técnica de eletroforese alcalina em gel. O fármaco sem tratamento demonstrou ser mais tóxico, para *D. magna*, em comparação com as amostras tratadas, sendo o valor de fator de toxicidade (FT) igual 4 antes do tratamento e ≤ 2 após os tratamentos por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para *D. subspicatus*, não foi observada toxicidade anterior e posterior aos tratamentos. A exceção, para ambos os bioindicadores, foi o tratamento de 240 minutos por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi altamente tóxico para *D. magna* e *D. subspicatus*, sendo o FT > 32. Observou-se efeito genotóxico de losartana potássica na sua forma inalterada e após degradação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contudo, para o tratamento por fotólise houve a atenuação deste efeito nocivo. Através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), verificou-se a completa degradação do fármaco a partir de 30 minutos de degradação para ambos os tratamentos, porém, houve formação de intermediários. Constata-se que, apesar dos baixos valores de FT para o ensaio agudo e crônico, o fármaco losartana potássica é potencialmente genotóxico para *D. magna*. Porém, é um medicamento facilmente degradado por radiação UV-C, sendo o tratamento por fotólise uma alternativa para a remoção deste contaminante sem potencializar efeitos de toxicidade aguda, crônica e genotóxica, o que não se aplica ao tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** Fármaco. *Daphnia magna*. *Desmodesmus subspicatus*. Processo avançado de oxidação. HPLC.

## ABSTRACT

ADAMS, Eliane. **Ecotoxicity and genotoxicity evaluation of losartan potassium after UVC photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process.** 80 f. Course Completion Work. Bachelor in Chemistry. University Technological Federal of Paraná. Curitiba, 2019.

Losartan potassium is a drug belonging to the hypertensive AT<sub>1</sub> receptor inhibitor of angiotensin II class, which evokes vasoconstriction and elevation of blood pressure. It is widely used in the arterial hypertension and heart failure treatment, being the most commonly used antihypertensive in Brazil. The inefficiency of conventional methods in wastewater treatment for removal of emerging contaminants contributes to the drugs insertion in water bodies, such as losartan potassium and its active carboxylic acid metabolite, losartan potassium concentrations from 0.295 ng L<sup>-1</sup> to 2.5 mg L<sup>-1</sup> were found in the environment, so it is necessary the study and application of complementary techniques for this xenobiotic removal. In this sense, the objective was to evaluate the degradation, ecotoxicity and genotoxicity of the drug losartan potassium (2.5 mg L<sup>-1</sup>) after treatment by photolysis (UVC radiation) and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. For reaching this goal, acute tests were performed by using *Daphnia magna* (NBR 12713:2016) and chronic tests with *Desmodesmus subspicatus* (NBR 12648:2018). To evaluate the genotoxicity, the comet assay was performed with *D. magna* cells by applying the alkaline gel electrophoresis technique. The untreated drug was more toxic for *D. magna* compared to the treated samples, with the toxicity factor (TF) value equal to 4 before treatment and ≤ 2 after treatments by photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For *D. subspicatus*, no previously treated and post-treatment toxicity was found. The exception for both bioindicators was the treatment of 240 minutes by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, which was highly toxic for *D. magna* and *D. subspicatus*, with FT > 32. A genotoxic effect of losartan potassium was observed in its unchanged structure and after UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation, however, for the treatment by photolysis the attenuation of this harmful effect was observed. By means of high performance liquid chromatography (HPLC), the drug's complete degradation was verified from 30-minute-degradation for both treatments. However, degradation subproducts came up. It is observed that, despite the low FT values for the acute and chronic assay, the drug is genotoxic to *D. magna*. Even though it is a drug easily degraded by UVC radiation treatment by photolysis, it can be an alternative for removal of this contaminant without potentiating acute, chronic and genotoxic toxicity effects, which does not apply to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

**Palavras-chave:** Pharmaceutical drug. *Daphnia magna*. *Desmodesmus subspicatus*. Advanced oxidation process. HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatógrafo líquido de alta eficiência .....	17
<b>Figura 2.</b> Possíveis rotas de inserção de fármacos no ambiente aquático .....	20
<b>Figura 3.</b> Origem da losartana potássica .....	22
<b>Figura 4.</b> Metabólito farmacologicamente ativo E-3174.....	24
<b>Figura 5.</b> Exemplar de <i>Daphnia magna</i> .....	31
<b>Figura 6.</b> Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	32
<b>Figura 7.</b> Fluxograma dos procedimentos a serem executados .....	32
<b>Figura 8.</b> Reator fotoquímico utilizado nos processos avançados de oxidação.....	36
<b>Figura 9.</b> Consumo de peróxido de hidrogênio em função do tempo .....	37
<b>Figura 10.</b> Classificação dos danos genéticos obtidos através do ensaio cometa ...	44
<b>Figura 11.</b> (A) Representação gráfica e regressão linear para quantificação de losartana potássica. (B) Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear.....	48
<b>Figura 12.</b> (A) Cromatograma de losartana potássica sem e após tratamento por radiação UVC e (B) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
<b>Figura 13.</b> (A) Cromatograma de losartana potássica após SPE de amostras tratadas por 60, 90, 120, 240 e 480 minutos através de fotólise e (B) 90, 120, 240 e 480 minutos através de processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
<b>Figura 14.</b> (A) Inibição do crescimento algáceo de <i>D. subspicatus</i> em função dos valores de FD de cada solução-teste, para losartana potássica sem e após tratamento por fotólise e (B) UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	57
<b>Figura 15.</b> Inibição média do crescimento algáceo de <i>D. subspicatus</i> para losartana potássica, sem e após tratamentos por fotólise e processo UV/H <sub>2</sub> O. ....	60
<b>Figura 16.</b> Análise genotóxica da losartana potássica 2,5 mg L <sup>-1</sup> e após tratamento de 480 minutos por fotólise e UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	61
<b>Figura 17.</b> Carta-controle de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> ao ZnSO <sub>4</sub> .....	76
<b>Figura 18.</b> Curva analítica de absorvância em função de células algáceas de <i>D. subspicatus</i> .....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentrações de losartana potássica em ambiente aquático (corpos hídricos), afluente e efluente de ETE e ETA .....	25
<b>Tabela 2.</b> Proporções utilizadas de suspensão algácea (inóculo), DIN, água e amostra para cada solução-teste .....	41
<b>Tabela 3.</b> Dados de concentração, áreas do pico cromatográfico, desvio padrão e CV para os pontos selecionados para construção da curva analítica .....	46
<b>Tabela 4.</b> Dados de regressão da curva analítica e análise estatística (ANOVA) para o método analítico de quantificação de losartana potássica por HPLC-DAD .....	47
<b>Tabela 5.</b> Imobilidade média (%) para <i>D. magna</i> exposta a diferentes fatores de diluição de losartana potássica não tratada e após intervalos de tempo de tratamento por fotólise .....	52
<b>Tabela 6.</b> Imobilidade média (%) para <i>D. magna</i> exposta a diferentes fatores de diluição de losartana potássica não tratada e após intervalos de tempo de tratamento por UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	54
<b>Tabela 7.</b> Fator de toxicidade (FT) para <i>D. magna</i> correspondentes ao tratamento por fotólise e processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , em seus respectivos tempos de degradação .....	55
<b>Tabela 8.</b> Fator de toxicidade (FT) para <i>D. subspicatus</i> correspondentes ao tratamento por fotólise e processo UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , em seus respectivos tempos de degradação .....	58
<b>Tabela 9.</b> Reagentes utilizados nas soluções-estoques e volumes adicionados para preparar 1 L de meio M4 e água de diluição .....	78
<b>Tabela 10.</b> Constituição do meio DIN pré-cultura e para o bioensaio .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Abs	Absorbância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	Processo avançado de oxidação (do inglês <i>Advanced Oxidation Process</i> )
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para 50 % dos organismos-teste
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CT	Controle negativo
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>Diode Array Detector</i> )
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50 % dos organismos-teste
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ETA	Estação de Tratamento de água
ETDI	Estação de Tratamento de Despejo Industrial
ETE	Estação de Tratamento de Efluente
FD	Fator de diluição
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FM	Fase Móvel
FT	Fator de toxicidade
G.L	Grau de liberdade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Performance Liquide Chromatography</i> )
ICA	Inibição de Crescimento Algáceo
ISO	<i>Internation Organization for Standardization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NBR	Norma Brasileira
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
QM	Quadrado médio
QR	Quociente de risco ecológico
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i> )
SQ	Soma dos Quadrados
VC	Valor crônico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	15
3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	15
3.2	FÁRMACOS NO AMBIENTE	18
3.3	LOSARTANA POTÁSSICA	21
3.3.1	losartana potássica no ambiente	24
3.4	DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS POR FOTÓLISE E UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	26
3.5	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	29
3.5.1	Ecotoxicidade com <i>Daphnia magna</i>	31
3.5.2	Ecotoxicidade com <i>Desmodesmus subspicatus</i>	32
3.5.3	Genotoxicidade com <i>Daphnia magna</i> através do ensaio Cometa	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	35
4.1	DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO LOSARTANA POTÁSSICA POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35
4.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	38
4.3	ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO <i>Daphnia magna</i>	40
4.4	ECOTOXICIDADE CRÔNICA UTILIZANDO <i>Desmodesmus subspicatus</i>	41
4.5	ENSAIO COMETA UTILIZANDO <i>Daphnia magna</i>	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	46
5.1	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	46
5.1.1	Curva analítica	46
5.1.2	Avaliação da degradação de losartana potássica por HPLC-DAD	48
5.2	ECOTOXICIDADE AGUDA DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA <i>Daphnia magna</i> , APÓS FOTÓLISE E PROCESSO UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52
5.3	ECOTOXICIDADE CRÔNICA DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA <i>Desmodesmus subspicatus</i> APÓS TRATAMENTO POR FOTÓLISE E UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56
5.4	GENOTOXICIDADE DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA <i>Daphnia magna</i> APÓS TRATAMENTO POR FOTÓLISE E UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	61
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	64
	<b>REFERÊNCIAS</b>	65
	<b>APÊNDICE A</b>	76
	<b>APÊNDICE B</b>	77
	<b>ANEXO A</b>	78
	<b>ANEXO B</b>	80

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, 36 milhões de habitantes possuem hipertensão arterial, cuja disfunção caracteriza-se pela pressão sanguínea igual ou superior a 140 x 90 mmHg. O consumo de medicamentos que atuam no sistema cardiovascular representa 35,9 % do uso total de medicamentos no país e destes, 36,9 % são anti-hipertensivos classificados como inibidores do receptor  $AT_1$  do peptídeo angiotensina II, classe à qual pertence a losartana potássica (COZAAR®, 2013; BERTOLDI et al., 2016; MALACHIAS et al., 2016).

A losartana potássica é o anti-hipertensivo mais consumido no Brasil. Em 2014 foi o medicamento mais vendido em comparação a outras categorias de compostos farmacêuticos e, segundo o último anuário estatístico do mercado farmacêutico, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) referente ao ano de 2017, foi o segundo medicamento mais vendido no país, sendo comercializados de 150 milhões a 200 milhões de unidades (CFF, 2015; ANVISA, 2018). Quando consumida, a losartana potássica é metabolizada e convertida em seu metabólito ácido carboxílico ativo E-3174 que, em conjunto com o princípio ativo, atua no controle da pressão arterial. No entanto, o organismo não absorve integralmente a dose do medicamento, excretando 4 % na forma inalterada e 6 % como E-3174, que são destinados a estações de tratamento através da rede coletora de esgotos (COZAAR®, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015).

Além dos efluentes domésticos, os efluentes industriais também contribuem para a disponibilização da losartana potássica no ambiente, sendo detectadas concentrações em  $ng L^{-1}$  a  $\mu L^{-1}$  do fármaco em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), despejos industriais (ETDI) e água (ETA), afluentes de ETE, assim como em corpos d'água como córregos e zonas costeiras (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2012; MARGOT et al., 2013; OOSTERHUIS; SACHER; TER LAAK, 2013; SANTOS et al., 2013; GONÇALVES, 2016; KOT-WASIK; JAKIMSKA; ŚLIWKA-KASZYŃSKA, 2016; PEREIRA et al., 2016).

A presença deste xenobiótico no ambiente justifica-se pelo sistema de tratamento convencional não garantir a remoção eficiente de compostos farmacêuticos, uma vez que estações de tratamento de efluentes visam, principalmente, o abatimento da matéria carbonácea biodegradável, nitrogênio,

fósforo e coliformes, não sendo específicos para a remoção de contaminantes emergentes (SPERLING, 2002; PEREIRA et al., 2016). As concentrações ambientais, normalmente na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , muitas vezes não são capazes de gerar efeitos agudos e crônicos, visto que os valores de  $\text{CE}_{50}$  e CENO para organismos como microcrustáceos (*Daphnia magna*, *Daphnia similis*) e peixes (*Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*), assim como a CENO e CEO para microalgas (*Selenastrum capricornutum*, *Desmodesmus subspicatus*, *Mycrocystis aeruginosa*), são na ordem de  $\text{mg L}^{-1}$  (FDA, 2002; YAMAMOTO et al. 2012; CARNEIRO, 2017). Contudo, estudos apontam o efeito genotóxico de losartana potássica para *Daphnia magna* (CARNEIRO, 2017), assim como risco ecológico para *Lemna minor* (GODOY; KUMMROW; PAMPLIN, 2015), na concentração encontrada por Larsson, Pedro e Paxeus (2007) em efluente de ETDI.

Os tratamentos por radiação ultravioleta (UV) e por processo oxidativo avançado, como o tratamento fotoquímico UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, são alternativas amplamente estudadas para a degradação de fármacos em substâncias mais simples e atóxicas (CANONICA; MEUNIER; VON GUNTEN, 2008; KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009a; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009b; MELO et al., 2009; YUAN et al., 2009; YUAN et al., 2011; TAN et al., 2013; ALI, et al., 2017), inclusive para losartana potássica (STARLING et al., 2019). Contudo, a degradação incompleta é capaz de potencializar o efeito nocivo do(s) xenobiótico(s), devido à geração de intermediário(s) tóxico(s), portanto, faz-se necessário o estudo ecotoxicológico após os tratamentos (MELO et al., 2009; RIZZO, 2011). Para a detecção de subprodutos e estudo da cinética de degradação, têm-se como ferramenta a cromatografia, como a cromatografia líquida de alta eficiência, que é uma técnica sensível para análise de traços (ALI et al., 2017; CARPINTEIRO et al. 2019; STARLING et al., 2019).

Neste sentido, o presente trabalho teve como principais objetivos a degradação da losartana potássica por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avaliando a genotoxicidade e ecotoxicidade aguda, antes e após os tratamentos, através do bioindicador *Daphnia magna* (ABNT NBR 12713:2018) e a ecotoxicidade crônica com *Desmodesmus subspicatus* (ABNT NBR 12648:2016), sendo analisada a degradação do fármaco e formação de subprodutos através da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade e genotoxicidade do fármaco losartana potássica antes e após tratamento por radiação UVC e por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a degradação do fármaco losartana potássica por fotólise e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- Validar o método para quantificação de losartana em amostras aquosas por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD);
- Avaliar a degradação de losartana potássica por fotólise (radiação UVC) e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por análise cromatográfica (HPLC-DAD);
- Avaliar a ecotoxicidade aguda de losartana potássica, antes e após a degradação por fotólise (radiação UVC) e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de ensaio com *Daphnia magna*;
- Avaliar a ecotoxicidade crônica de losartana potássica, antes e após a degradação por fotólise (radiação UVC) e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através de ensaio com *Desmodesmus subspicatus*;
- Avaliar a genotoxicidade de losartana potássica, antes e após a degradação por fotólise (radiação UVC) e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando células de *Daphnia magna*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os avanços dos métodos analíticos permitiram que contaminantes ambientais, como os fármacos, pudessem ser detectados e, muitas vezes, quantificados, em matrizes complexas e/ou em baixas concentrações (BILA; DEZOTTI, 2003; GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2012; BAYER et al., 2014). Dentre os métodos utilizados há a cromatografia, uma técnica de separação empregada para a identificação e/ou quantificação de inúmeras substâncias químicas, tais como fármacos, drogas, agrotóxicos, poluentes em matrizes ambientais, compostos estruturalmente semelhantes, dentre outros. A elevada sensibilidade, eficiência e rapidez dos métodos cromatográficos a torna uma técnica amplamente utilizada (FORGÁCS; CSERHÁTI, 1997; COLLINS et al., 2006).

A separação cromatográfica baseia-se no princípio da migração diferencial advinda da interação dos analitos presentes na amostra entre uma fase móvel (líquido, gasoso ou fluído supercrítico) e uma fase estacionária (sólido ou líquido), cuja afinidade influencia diretamente no tempo de retenção da substância, uma vez que, quanto maior a interação entre ambos, maior o tempo de eluição. Os mecanismos de separação incluem processos físicos (adsorção e absorção), químicos (troca iônica, bioafinidade) ou mecânicos (exclusão por tamanho molecular) (GIDDINGS, 1965; COLLINS et al., 2006; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Para amostras complexas ou contendo baixas concentrações do analito, há a necessidade de preparo de amostra, a fim de evitar a presença de interferentes e/ou propiciar a pré-concentração da amostra para níveis detectáveis e/ou quantificáveis do analito de interesse pela técnica cromatográfica empregada, seja a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ou cromatografia gasosa (CG). A técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é a mais utilizada, sendo um método de separação sólido-líquido que emprega sorventes compactados em cartuchos (tipo

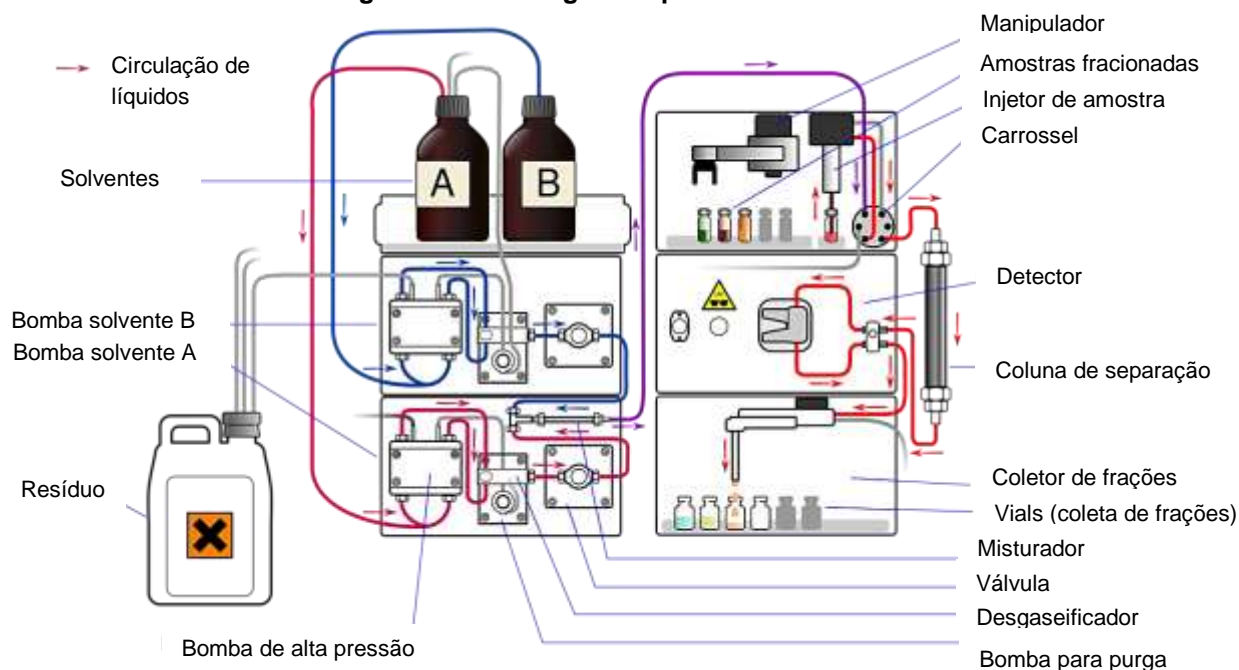


seringa), que interage com os analitos presente em amostra líquida e propicia diferentes estratégias para tornar a amostra adequada à análise. O procedimento de SPE inclui o condicionamento do material empacotado com solvente adequado, aplicação da amostra, eluição dos interferentes (quando necessário) e eluição do analito (JARDIM, 2010). Há diversos tipos de sorventes utilizados, sendo sua escolha uma etapa crucial para definir o sucesso do procedimento, dentre os quais se destacam: octadecil (C18), octil (C8), butil (C4), polímeros lipofílicos como o divinilbenzeno, monômeros hidrofílicos como N-vinilpirrolidona, cicloexil, dentre muitos outros. A combinação de polímeros também é possível, sendo comercializado o poli(divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona), conhecido como Oasis® HLB e também o estireno-divinilbenzeno, comercializado como Strata® SDB-L (JARDIM, 2010; STANKIEWICZ et al., 2015).

A cromatografia líquida caracteriza-se por ser uma técnica rápida, sensível, com elevada capacidade de resolução de picos e que requer pequenos volumes de amostra (poucos microlitros). O equipamento básico é constituído por bomba(s) de alta pressão (até 400 atm) conectadas a recipientes com solventes apropriados, sistema de injeção de amostra e detector; os equipamentos completos dispõem também de unidade de desgaseificação de solvente, amostrador automático, termostatizador de coluna e coletor de frações (para análises em escala preparativa) sendo possível visualizar um exemplo de estrutura de sistema cromatográfico na Figura 1. Há a pressurização para permitir a passagem de fase móvel através da coluna, cujo recheio contém a fase estacionária com partículas de tamanho reduzido, entre 2,5 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (VALENTE; COLLINS; MANFREDI, 1969; COLLINS et al., 2006; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Através da cromatografia líquida de alta eficiência é possível separar inúmeras substâncias, sendo as análises registradas através de cromatogramas, cujas áreas das bandas são aplicadas como parâmetro para a quantificação do(s) analito(s) de interesse. A área do pico cromatográfico pode ser obtida através da integração do sinal detectado, havendo a relação entre a área e a concentração da substância de interesse (COLLINS et al., 2006; ISMAIL, 2017).

**Figura 1. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.**



Fonte: traduzido de <https://chemdictionary.org/hplc/> (2019).

Para fármacos, como a losartana potássica e seu metabólito ativo, há diferentes métodos em cromatografia líquida aplicados para a detecção e/ou quantificação dos mesmos (LEE; SHIM; LEE, 1996; GONZALEZ et al., 2002; HERTZOG et al., 2002; POLINKO et al., 2003; DOS PASSOS; DIAS; BERGOLD, 2005; SATHE; BARI; 2007; BONFILIO et al., 2010; ANDERSON et al., 2017; REQUE, 2017; BABARAHIMI et al., 2018).

### 3.1.1 Validação do método

Para o desenvolvimento e empregabilidade de um método cromatográfico é preciso investigar parâmetros de figuras de méritos que validem as quantificações decorrentes de sua utilização, conferindo confiabilidade aos dados obtidos. Dentre alguns parâmetros estabelecidos para validação do método, têm-se (BRASIL, 2011, ANVISA, 2017):

- **Precisão:** corresponde à dispersão de resultados obtidos a partir de análises repetidas em um mesmo nível de concentração, sendo avaliada a proximidade dos

dados através do cálculo do desvio padrão relativo (coeficiente de variação). A precisão pode ser determinada pela repetibilidade, reprodutibilidade ou precisão intermediária.

- Exatidão: representa o grau de concordância dos resultados determinados experimentalmente com o valor tido como verdadeiro. É determinado através da análise de material de referência certificado, por ensaios de recuperação, adição de padrão e/ou por comparação com métodos oficiais já validados. É estabelecido no mínimo 9 análises para verificação da exatidão, ou seja, é necessário três concentrações (baixa, média, alta) em triplicata
- Limite de detecção (LD): é a menor quantidade do analito capaz de ser detectado (mas não quantificado) nas condições cromatográficas de análise, (ANVISA, 2017).
- Limite de quantificação (LQ): é a menor concentração de analito passível de ser quantificada pelo método de análise, apresentando exatidão e precisão aceitáveis (ANVISA, 2017).
- Linearidade: é a capacidade do método analítico fornecer respostas (área de pico cromatográfico) diretamente proporcionais à concentração do analito, possibilitando a construção de uma regressão linear. Essa deve ser determinada por um número mínimo de cinco concentrações, em triplicata, compreendendo o intervalo no qual espera-se realizar a aplicação do método, preferencialmente a partir de seu limite de quantificação. O critério de aceitação desse parâmetro deve ser definido conforme critérios para o coeficiente de correlação ( $r$ ), dispersão dos erros e desvio padrão dos coeficientes angular e linear.

### 3.2 FÁRMACOS NO AMBIENTE

Os contaminantes emergentes, estudados desde 1995 no Brasil, são substâncias encontradas no ambiente cujo efeito é pouco conhecido, incluindo fármacos, pesticidas, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas, sucralose (e outros adoçantes artificiais), hormônios, microplásticos, entre muitos outros (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). A presença destes compostos é capaz de provocar efeitos crônicos à comunidade biótica e abiótica, visto as baixas

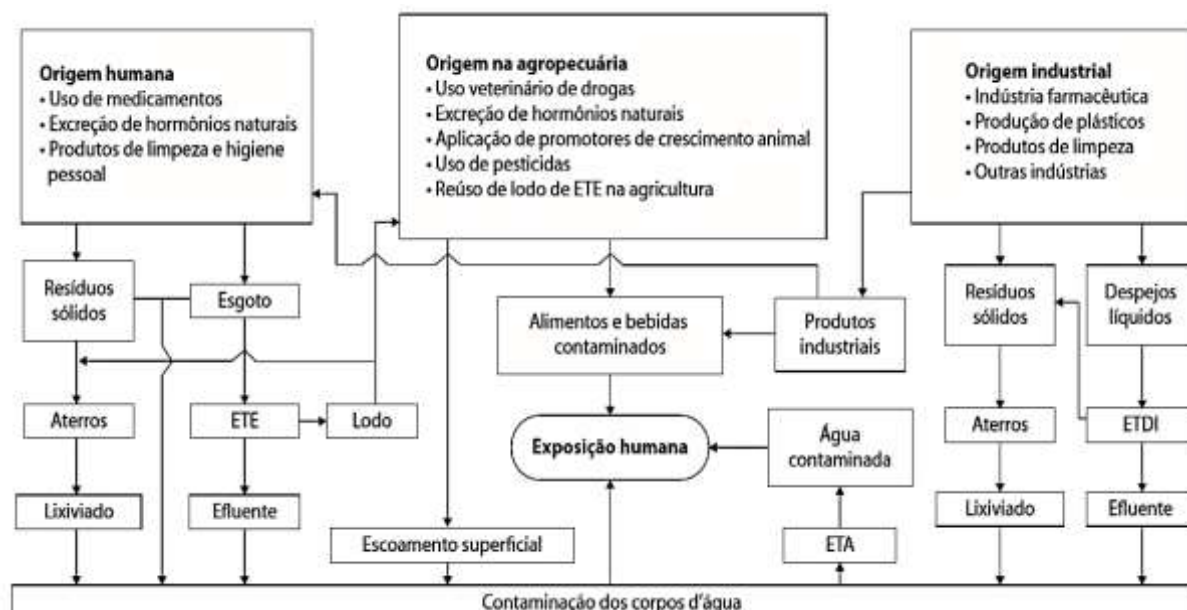
concentrações ambientais encontradas, que vão de  $\text{ng L}^{-1}$  até  $\mu\text{g L}^{-1}$  (BILA; DEZOTTI, 2003; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Os fármacos são inseridos no ambiente através do processo de fabricação, uso humano ou veterinário (Figura 2). As principais fontes pontuais destes contaminantes são: efluentes e resíduos de indústrias farmacêuticas, excreção após o tratamento terapêutico por humanos e animais, efluentes e resíduos de clínicas, hospitais e estabelecimentos da área da saúde, assim como aquicultura, criação de gado, suínos e aves que fazem uso de antibióticos e hormônios a fim de aumentar a produção (BILA; DEZOTTI, 2003; LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007; ZAPPAROLI; CAMARA; BECK, 2011; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Além disso, o déficit de saneamento básico e o mau gerenciamento de resíduos sólidos e efluentes também contribuem para a inserção de substâncias farmacêuticas no ambiente (SILVA et al., 2011).

Estações de tratamento de efluentes (ETE) abrangem processos que visam à estabilização da matéria carbonácea, remoção dos patógenos e redução da concentração de fósforo e nitrogênio, existindo para isso lagoas de estabilização que são caracterizadas pela presença de bactérias anaeróbias e aeróbias responsáveis pela digestão do efluente antes do lançamento em corpos d'água (SPERLING, 2002).

Devido a pouca biodegradabilidade ou degradação parcial de muitos compostos farmacêuticos, os processos biológicos não são eficazes na remoção destas substâncias presentes na fase aquosa, portanto, são lançados em corpos hídricos receptores, passando a fazer parte da constituição de águas superficiais (ZAPPAROLI; CAMARA; BECK, 2011; BOGER et al., 2015; VETTORELLO et al., 2017). Os fármacos, muitas vezes substâncias hidrofóbicas, possuem a tendência em adsorver em sólidos suspensos, favorecendo a remoção por sedimentação ou floculação em ETE, estações de tratamento de despejos industriais (ETDI) e de água (ETA), contudo, há apenas a transferência do meio líquido para o lodo, o qual requer a disposição adequada para não haver contaminação do solo (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

**Figura 2. Possíveis rotas de inserção de fármacos no ambiente aquático**



Fonte: AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO (2013).

No Brasil, a Portaria nº 2914/2011 dispõe sobre os padrões de potabilidade da água para consumo humano, estipulando concentrações máximas permitidas de substâncias químicas prejudiciais à saúde humana como metais, solventes, desinfetantes, agrotóxicos, dentre diversos outros compostos orgânicos e inorgânicos. Há também limites máximos para coliformes totais e fecais, cianotoxinas e padrões organolépticos. No entanto, não há valores máximos permitidos para fármacos em água para abastecimento doméstico. Tendo em vista a ampla utilização de medicamentos no país (4,5 bilhões de produtos comercializados em 2017) (ANVISA, 2018) e os processos adotados em ETEs e ETAs não visarem à remoção de fármacos residuais, conclui-se que há a necessidade de adequações da legislação, a fim de minimizar os efeitos crônicos gerados pela exposição a compostos farmacêuticos (BRASIL, 2011; BOGER et al., 2017; VETTORELLO et al., 2017).

As substâncias farmacêuticas (anti-hipertensivos, antibióticos, analgésicos, hormônios, antiinflamatórios, contrastes de raio-X, antilipêmicos), por serem compostos bioativos, acarretam efeitos aos organismos quando presentes no meio ambiente, incluindo o crescimento de populações de bactérias resistentes, mudança comportamental, alimentar e estrutural de organismos aéreos, aquáticos e terrestres, assim como a desregulação endócrina que acarreta disfunções reprodutivas em

diversas espécies de aves, peixes, mexilhões, tartarugas e em humanos. A perturbação endócrina em seres humanos está relacionada ao câncer de mama e próstata, endometriose, ovários policísticos, criptorquidia e infertilidade masculina (SANTAMARTA, 2001; BILA; DEZOTTI, 2003; NUNES, 2010).

### 3.3 LOSARTANA POTÁSSICA

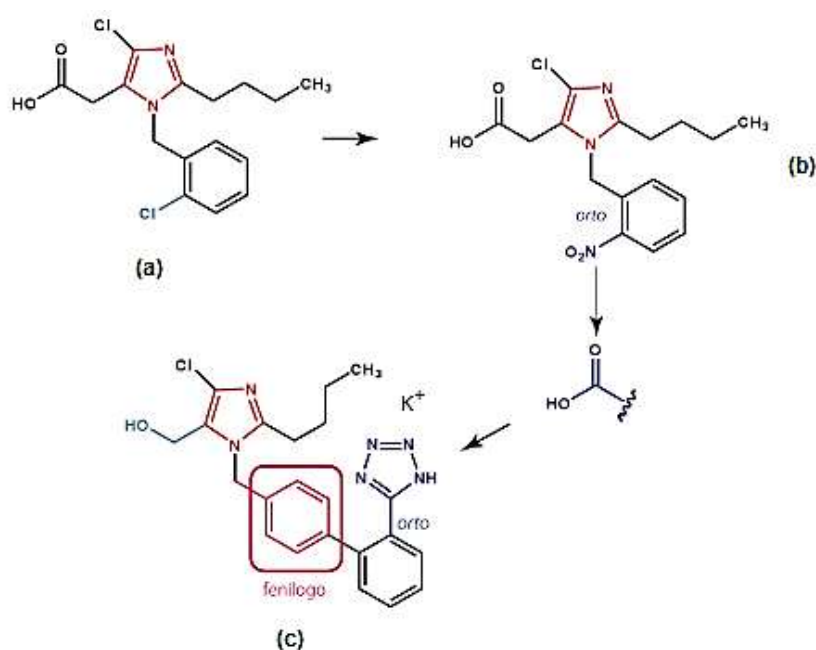
Os fármacos anti-hipertensivos são os mais utilizados no Brasil, representando 35,9 % do uso e destes, 36,9 % são da classe dos inibidores AT<sub>1</sub> da angiotensina II, cujo medicamento mais administrado é a losartana potássica (BERTOLDI et al., 2016). No ano de 2014, o fármaco mais vendido no país foi o produto genérico da losartana potássica, produzido pela Neo Química (CFF, 2015) e de acordo com o último Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico, referente ao ano de 2017, a losartana potássica foi o 15º princípio ativo mais rentável e o 2º medicamento mais comercializado no Brasil, sendo distribuído entre 150 milhões e 200 milhões de unidades (ANVISA, 2018).

A síntese da losartana potássica teve como origem a substância de fórmula C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3a), com massa molecular igual a 341 g/mol, no entanto, seu desempenho ineficiente resultou na alteração do cloro na posição orto por um substituinte nitro (Figura 3b), também ineficiente. Modificações na estrutura e aperfeiçoamento da molécula deram origem a losartana potássica, cuja massa molecular (422 g/mol) é mais elevada que a substância de origem e a especificidade ao receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II é eficaz, atingindo o propósito de redução da pressão arterial (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Lançada em 1995, a losartana potássica (Figura 3c) foi o primeiro anti-hipertensivo bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II, aprovado para uso clínico (HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011). Demais fármacos pertencentes a esta classe de anti-hipertensivo foram lançados (candesartana, eprosartan, irbesartan, olmesartana e valsartana), compondo o grupo conhecido como sartanas (BAYER et al., 2014). É um anti-hipertensivo bloqueador do receptor da angiotensina II, ligando-se de forma seletiva e competitiva a angiotensina II do subtipo 1 (AT<sub>1</sub>), que é responsável pela vasoconstrição, portanto, o medicamento

age de forma a impedir a redução do calibre do vaso sanguíneo e a pressão arterial não se eleva. A angiotensina II é um octapeptídeo (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) que compõe o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), regulando as funções cardiovasculares e renais, portanto, é encontrada no músculo cardíaco e vascular, glândulas adrenais e rins (GOA; WAGSTAFF, 1996; LEITE, 2011; LOSARTANA POTÁSSICA, 2011; COZAAR®, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015).

**Figura 3. Origem da losartana potássica.**



**Legenda: (a) Protótipo inicial na síntese da losartana potássica. (b) Molécula criada anterior à losartana. (c) Losartana potássica.**

**Fonte: Adaptado de Barreiro e Fraga (2015).**

O Quadro 1 apresenta as propriedades físico-químicas da losartana potássica e informações farmacológicas.

O medicamento é comercializado na forma de comprimidos com 50 a 100 mg de losartana potássica. Após a administração oral, há a redução homogênea da pressão arterial, atingindo o máximo de eficácia após 5 a 6 horas da ingestão e, decorrendo 3 a 6 semanas, há o efeito anti-hipertensivo máximo (COZAAR®, 2013).

**Quadro 1. Propriedades físico-químicas e farmacologia da losartana potássica**

Nome Químico	Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2Htetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-metanol
Nome Comercial	Cozaar®
Número CAS	124750-99-8
Sinônimos	Losartan, Losartana
Fórmula Molecular	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>6</sub> O. K
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	461,00
Aspecto	Pó cristalino branco
Coef. partição octanol/água (Log Kow)	3,01
pka	4,9
Solubilidade em água	Solúvel (3.300 mg L <sup>-1</sup> )
Solubilidade em etanol	Solúvel
Volatilidade	Não volátil
Pressão de Vapor a 25 °C (mm Hg)	1,64 x 10 <sup>-26</sup>
Ponto de Fusão (°C)	183,5 – 184,5
Coef. Adsorção em solo (Koc) (L kg <sup>-1</sup> )	5,69 x 10 <sup>5</sup>
Estabilidade	Estável à hidrólise e biodegradação. Fotodegradável
Meia-vida biológica (h)	2

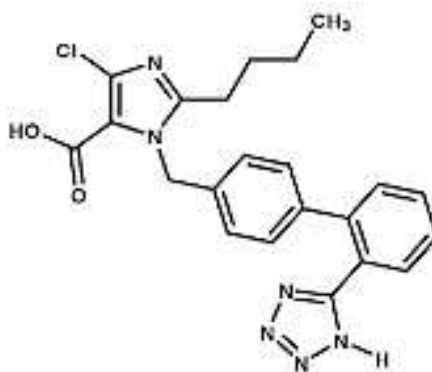
Fonte: REQUE, 2017.

Após a dose, o fármaco é absorvido pelo organismo e liga-se a proteínas plasmáticas (albumina). Possui disponibilidade sistêmica de 33 %, convertendo-se em metabólitos inativos e, aproximadamente, 14 a 15 % da dose transforma-se no metabólito ácido carboxílico ativo E-3174 (Figura 4) (COZAAR®, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015).

O metabólito E-3174 é resultante do processo de oxidação decorrente da ação das enzimas CYP3A4 e CYP2C9, pertencentes ao sistema enzimático Citocromo P450, havendo inserção de um oxigênio ao grupamento álcool benzílico, originando um ácido carboxílico. O metabólito ativo é cerca de 10 a 40 vezes mais potente que a losartana potássica em sua forma inalterada, sendo sua meia-vida de 6 a 9 horas (SILVADO, 2008; PAPICH, 2012; COZAAR®, 2013; BARREIRO; FRAGA, 2015).



Figura 4. Metabólito farmacologicamente ativo E-3174.



Fonte: Barreiro e Fraga (2015).

### 3.3.1 losartana potássica no ambiente

A losartana potássica, quando consumida por via oral, é excretada através da urina em sua forma inalterada (4 % da dose) e também como metabólito ativo (6 % da dose). Tendo em vista o amplo consumo e produção deste fármaco no Brasil, bem como o sistema convencional de tratamento de efluentes ineficiente, detecta-se este fármaco em água do mar, regiões costeiras e córregos (GONÇALVES, 2016; PEREIRA et al., 2016; CORTEZ, 2018).

Pesquisas em outros países também quantificaram a losartana potássica em corpos hídricos (GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2012), afluentes e efluentes de ETEs, ETA e efluente de ETDI (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007; ANSES, 2011; HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2011; GROS; RODRÍGUEZ-MOZAZ; BARCELÓ, 2012; MARGOT et al. 2013; OOSTERHUIS; SACHER; TER LAAK, 2013; SANTOS, 2013; BAYER et al. 2014; GONÇALVES, 2016; KOT-WASIK; JAKIMSKA; ŚLIWKA-KASZYŃSKA, 2016), cujos valores de concentração estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Concentrações de losartana potássica em ambiente aquático (corpos hídricos), afluente e efluente de ETE e ETA.**

(continua)		
<b>Origem</b>	<b>Autor(es) / País</b>	<b>Concentração (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Corpos hídricos	Gros, Rodríguez-Mozaz, Barceló (2012) / Espanha	4 – 34
	Gonçalves (2016) / Brasil	<1,8 – 574,9
	Pereira et al. (2016) / Brasil	11,8 – 32
	Cortez et al. (2018) / Brasil	0,295 - 8,70
Afluente de ETE	Gros, Rodríguez-Mozaz, Barceló (2012) / Espanha	125 - 366
	Margot et al. (2013) / Suíça	2405
	Oosterhuis, Sacher, Ter Laak (2013) / Holanda	500 - 790
	Kot-Wasik, Jakimska, Śliwka-Kaszyńska (2016) / Polônia	299,9–1708,8
Afluente de ETE hospitalar	Santos et al. (2013) / Portugal	237
Efluente de ETE	Gros, Rodríguez-Mozaz, Barceló (2012) / Espanha	75 – 27
	Margot et al. (2013) / Suíça	510
	Oosterhuis, Sacher, Ter Laak, 2013	60 – 90
	Bayer et al (2014) / Alemanha	210
	Kot-Wasik, Jakimska, Śliwka-Kaszyńska (2016) / Polônia	75,6–265,2
Efluente de ETE hospitalar	Santos et al (2013) / Portugal	143

**Tabela 1. Concentrações de losartana potássica em ambiente aquático (corpos hídricos), afluente e efluente de ETE e ETA.**

<b>Origem</b>	<b>Autor(es) / País</b>	<b>Concentração (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Efluente de ETDI	Larsson, Pedro, Paxeus (2007) / Índia	2400000 - 2500000
Afluente de ETA	Huerta-Fontela, Galceran, Ventura (2011) / Espanha	260
	ANSES (2011) / França	11
	Kot-Wasik, Jakimska, Śliwka-Kaszyńska (2016) / Polônia	6,3–16,3
Efluente de ETA	Gros, Rodríguez-Mozaz, Barceló (2012) / Espanha	5

O estudo realizado por Larsson, Pedro e Paxeus (2007) em Patancheru (Índia), analisou o efluente de uma ETDI que recebe contribuições de cerca de 90 indústrias farmacêuticas, sendo quantificado a maior concentração ambiental de losartana potássica, igual a 2,4 a 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Os autores inferem que a eliminação significativa do fármaco, no efluente industrial, é decorrente de falhas na minimização de perdas durante a fabricação do medicamento, o que requer investimentos na produção industrial.

### 3.4 DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS POR FOTÓLISE E UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A presença de compostos farmacêuticos em lençóis freáticos, águas superficiais e para abastecimento doméstico, assim como em águas residuais é comprovado em diversos estudos (TABAK; BUNCH, 1970; SEILER et al., 1999; SACHER et al., 2001; JUX et al., 2002; KIM et al., 2007; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE, GUWY, 2008; VALCÁRCEL et al., 2011; ARISTIZABAL-CIRO et al.,

2017; YANG et al., 2018) e, devido a toxicidade proveniente da biodisponibilização destas substâncias, recorrem-se a alternativas e tratamentos para a remoção de tais compostos persistentes no ambiente, como os processos avançados de oxidação e degradação através da fotólise. Na literatura, há diversos estudos aplicando estes tratamentos na remoção de fármacos presentes em água e efluentes (CANONICA; MEUNIER; VON GUNTEN, 2008; KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009a; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009b; MELO et al., 2009; YUAN et al., 2009; YUAN et al., 2011; TAN et al., 2013; ALI, et al., 2017), assim como para losartana potássica (STARLING et al., 2019).

A degradação por fotólise de fármacos ocorre pela incidência de radiação que pode ser tanto natural (raios solares) quanto artificial, promovida por lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa, média ou alta pressão, que também podem ser utilizadas nos processos avançados de oxidação (AOP, do inglês *Advanced Oxidation Process*). Compostos orgânicos, como substâncias farmacêuticas, absorvem os fótons emitidos e, desta forma, crescem em energia, ocorrendo a quebra da ligação química quando se alcança a energia de dissociação de ligação, existindo comprimentos de onda máximos que fornecem a energia necessária para a clivagem homolítica da ligação (PARSONS, 2004; KLAVARIOTI, MANTZAVINOS, KASSINOS, 2009; MELO et al., 2009). Apenas a radiação solar não promove a efetiva fotodegradação de fármacos em ETE, visto que a radiação solar muitas vezes atinge apenas as camadas superficiais das lagoas de estabilização, também podendo ser absorvida por microalgas, sólidos suspensos e pela matéria orgânica dissolvida, portanto, é ineficiente para a quebra das moléculas de fármacos em solução (ESTEVES, 2011; AQUINO, BRANDT; CHERNICHARO, 2013; ALI et al., 2017). Já a fotólise artificial, apesar do maior custo quando comparado com o anterior, promove a remoção de fármacos presente em água independentemente de fatores ambientais ou em período noturno (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

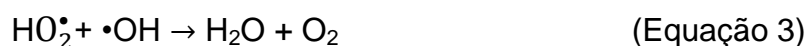
O tratamento de águas por AOP é uma alternativa promissora para degradação de fármacos, assim como há facilidade para adaptação de estações de tratamento para incluir este processo (STARLING et al., 2019) e um dos métodos utilizados é o processo fotoquímico UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que propicia a degradação do composto farmacêutico por meio da fotólise direta pela incidência de radiação ultravioleta (UV) em conjunto com a produção de espécies reativas de oxigênio no

sistema, através da clivagem fotolítica da ligação O-O do peróxido de hidrogênio, formando radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), cujo potencial padrão de redução é +2,73 V, caracterizando-o como um agente oxidante forte. (IKEHATA; NAGHASHKAR; GAMAL EL-DIN, 2006; KIM; YAMASHITA; TANAKA, 2009b; MELO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2016). O  $\bullet\text{OH}$  atua como um desencadeador de reações oxidativas, dando origem a novos radicais de acordo com a estrutura química do fármaco. Cadeias alifáticas tendem a formar radical peroxil ( $\text{RO}_2\bullet$ ), já anéis aromáticos podem gerar radical através da adição eletrofílica de uma hidroxila (MELO et al., 2009).

O comprimento de onda ( $\lambda$ ) mais comum para o tratamento UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  é de 254 nm, apesar de não ser o  $\lambda$  ideal, visto que a absorção máxima ocorre em 220 nm. Contudo, em  $\lambda = 254$  nm, há a clivagem homolítica do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em dois radicais hidroxilas (Equação 1). A região ultravioleta é dividida em UV-A, que compreende  $\lambda$  de 315 a 400 nm, UV-B ( $\lambda = 280$  a 315 nm) e UV-C ( $\lambda = 200$  a 280 nm), portanto, a radiação UV-C é a aplicada no processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (PARSONS, 2004; MELO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2016).



Os fatores que influenciam no tratamento UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  inclui o espectro de absorbância do composto farmacêutico, o rendimento quântico (probabilidade de se proceder a reação química quando há a absorção de fóton), o pH (há o consumo de  $\bullet\text{OH}$  por íons carbonato e bicarbonato, quando presentes), taxa de formação de  $\bullet\text{OH}$  e concentração do peróxido de hidrogênio, visto que a concentração excessiva possibilita interações entre o peróxido de hidrogênio e seus radicais (Equações 2 e 3), sendo possível até mesmo regenerar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Equação 4) (PARSONS, 2004; KLAVARIOTI; MANTZAVINOS; KASSINOS, 2009; MELO et al., 2009; KANAKARAJU; GLASS; OELGEMÖLLER, 2018).





O objetivo do AOP é mineralizar o composto até a obtenção de espécies químicas mais simples como CO<sub>2</sub>, água e íons inorgânicos. Entretanto, quando a degradação é incompleta, é possível a formação de subprodutos tão tóxicos quanto a substância de origem (MELO et al., 2009; YUAN et al., 2009; RIZZO, 2011; ARAÚJO et al., 2016). Desta forma, faz-se necessário o monitoramento ecotoxicológico para afirmação, ou não, da atenuação do efeito nocivo do xenobiótico ao ambiente mesmo após os tratamentos, sendo os ensaios ecotoxicológicos uma forma de verificação da viabilidade de aplicação do tratamento por fotólise ou AOP, na remoção de contaminantes emergentes (RIZZO, 2011).

### 3.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Normas e padronizações internacionais desenvolvidas pela *International Organization for Standardization (ISO)*, *Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)*, *Deutshces Institut fur Normung (DIN)*, *Environmental Protection Agency (EPA)* e *American Society for Testing and Materials (ASTM)* foram estabelecidas visando à uniformidade dos ensaios ecotoxicológicos. No Brasil, foram definidas as normas nacionais pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que está em concordância com os métodos da ISO e DIN (ELENDET; BIAS, 1990; KNIE; LOPES, 2004).

Dentre os tipos de ensaios ecotoxicológicos, há os agudos e crônicos. Os testes agudos consistem em expor o organismo-teste a altas concentrações do xenobiótico em um curto intervalo de tempo, gerando respostas imediatas e irreversíveis, sendo obtidos resultados de dose letal média (DL<sub>50</sub>), expressos em unidades de massa/massa e refere-se à dose da substância química fatal para 50 % dos organismos. Os resultados também podem ser apresentados como concentração efetiva ou letal mediana (CE<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub>), que é a dose ou concentração capaz de causar efeito agudo em 50 % dos organismos-teste. O fator de toxicidade (FT) também é uma forma de expressar dados advindos do ensaio agudo, expresso

de acordo com o fator de diluição (FD) da amostra, consistindo na maior diluição em que não se observa imobilidade maior do que 10 % dos organismos expostos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; KNIE; LOPES, 2006; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; ABNT, 2016).

O ensaio crônico baseia-se na exposição a baixas concentrações do composto químico por um período de tempo suficiente para se observar efeitos correspondentes ao ciclo de vida parcial (fase sensível) ou total do organismo, sendo possível também, constatar consequências danosas após várias gerações (AZEVEDO; CHASIN, 2004; KNIE; LOPES, 2006; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). O teste crônico é dependente do ensaio agudo, sendo que a concentração subletal é determinada a partir da  $CE_{50}$ ,  $DL_{50}$  ou FT. Dentre esta forma de bioensaio, incluem-se os ensaios genotóxicos ou enzimáticos, que constataam alterações no DNA e inibição de enzimas, respectivamente (WRIGHT; WELBOURN; 2002; KNIE; LOPES, 2004; MAGALHÃES; FERRAO FILHO, 2008).

Outra forma de classificação dos ensaios ecotoxicológicos é de acordo com a forma de adição da amostra, podendo ser estabelecido testes de sistema estático (não há renovação da solução-teste), sistema semi-estático (renovação intermitente da solução-teste que varia de acordo com as características da substância, como volatilidade, e conforme o organismo-teste, por exemplo, para o *Danio rerio* é a cada 24h, já para *Pimephales promelas* é a cada 48 h) e fluxo contínuo (renovação ininterrupta da solução-teste) (COSTA et al., 2008; RUBINGER, 2009).

Há uma ampla gama de espécies capazes de serem empregados como organismos-teste, portanto, selecionaram-se representantes de nível tróficos mais relevantes, a fim de padronizar os ensaios ecotoxicológicos, os quais foram: bactérias (decompositores), protozoários (consumidores primários), microcrustáceo (consumidores entre os metazoários) e peixes (consumidores finais), destacando-se os ensaios ecotoxicológicos com os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, as algas *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, a fotobactéria *Vibrio fischeri* e peixes como *Danio rerio* e *Pimephales promelas*, uma vez que são de fácil cultivo, sensíveis a diversos agentes tóxicos, possuem significância biológica e ampla distribuição geográfica (KNIE, LOPES, 2004; RIZZO, 2011).

### 3.5.1 Ecotoxicidade com *Daphnia magna*

O ensaio ecotoxicológico com *Daphnia magna* possui procedimentos padronizados pela ISO 6341, OECD nº 202 e NBR 12713. É um organismo zooplanctônico de água doce, pertencente ao filo Crustacea, ordem Cladocera e família Daphnidae. Na cadeia alimentar, caracteriza-se por ser um consumidor primário, cuja alimentação dá-se por filtração e inclui algas unicelulares, matéria particulada e detritos (KNIE; LOPES, 2004; ESTEVES, 2011).

Possui tamanho de 5 a 6 mm e reproduz-se por partenogênese em condições favoráveis, gerando descendentes geneticamente idênticos (fêmeas), o que proporciona resultados uniformes e constantes. O ciclo de vida da *D. magna* é curto, em média 45 dias, o que permite sua utilização em ensaios crônicos (KNIE, LOPES, 2004; ALVES, SILVANO, 2006; ESTEVES, 2011).

*Daphnia magna* (Figura 5) é internacionalmente reconhecida, desde a década de 80, como organismo-teste (DIN, 1982; ISO, 1982; OECD, 1984), possui alta relevância ecológica e ampla distribuição geográfica, a manutenção e cultivo em laboratório sob condições controladas é acessível, além disso, é sensível a diversas substâncias tóxicas, o que torna este microcrustáceo um bom bioindicador (KNIE; LOPES, 2004; CALOW, 2009; RODRIGUÉZ; DAO; WIEGAND, 2012).

**Figura 5. Exemplar de *Daphnia magna*.**



**Fonte: Autoria própria.**

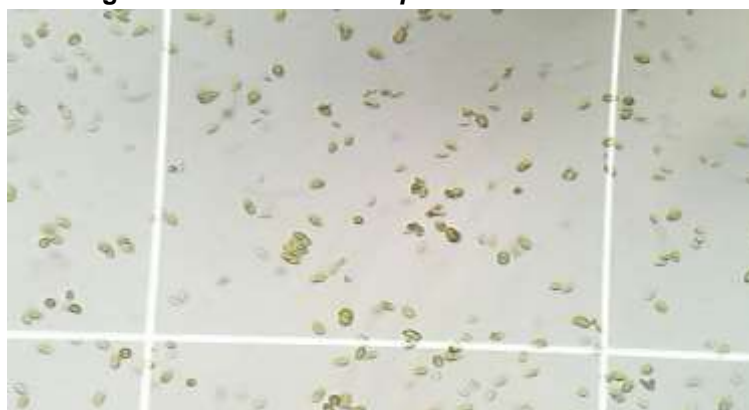


O ensaio agudo com *D. magna* tem como parâmetro de avaliação ecotoxicológica a capacidade natatória dos neonatos de 2 a 26 horas de vida, expostos ao agente tóxico por um período de 24 a 48 horas. Já o ensaio crônico visa constatar, além da mobilidade dos organismos, efeitos em longo prazo como reprodução, crescimento, deformações estruturais como anomalia nos espinhos pós-anais ou garras terminais (ELMOOR-LOUREIRO, 2004; KNIE; LOPES, 2004; MAGALHÃES; FERRAO FILHO, 2008). Os resultados dos ensaios agudos com *D. magna* podem ser expressos como  $CE_{50}$ , FT ou tóxico e não tóxico (forma qualitativa) (ABNT, 2016).

### 3.5.2 Ecotoxicidade com *Desmodesmus subspicatus*

A microalga *Desmodesmus subspicatus* (Figura 6) é um fitoplâncton de água doce do filo Chlorophyta e classe Chlorophyceae, presente em lagos mesotróficos ou eutróficos. Possui clorofila em plastídeos envoltos por uma membrana interna de celulose e outra externa de esporopolenina. Na natureza, há a tendência de formar agrupamentos de 5 a 6 células, no entanto, em laboratório a disposição mais comum é unicelular. Reproduz-se de forma assexuada através de autósporos gerados no interior da célula-mãe, cuja liberação ocorre pela lise desta célula (LÜRLING, 2003; KNIE; LOPES, 2004; ESTEVES, 2011; SOUZA; FELISBERTO, 2014; RAMOS; BICUDO; MOURA, 2015).

**Figura 6. Microalga *Desmodesmus subspicatus* vista em câmera de Neubauer**



**Fonte: Autoria própria.**

*D. subspicatus* é um dos principais produtores primários de água doce, influenciando diretamente na entrada de poluentes tóxicos na cadeia alimentar e, assim, contribuindo nos processos de bioacumulação e biomagnificação, o que pode vir a afetar a saúde humana. Além disso, é um bom indicador de poluição de águas estuarinas e costeiras, visto que é um organismo sensível a ampla gama de agentes nocivos (KNIE; LOPES, 2004; VILLARES et al., 2005; GARCÍA-SEOANE et al., 2018).

Ensaio ecotoxicológicos com a *Desmodesmus subspicatus* são contemplados pelas normas NBR 12648, OECD nº 201 e ISO 8692, sendo observados efeitos de inibição do crescimento algáceo. O tempo de exposição do bioensaio é de 72 horas e, devido ao crescimento rápido das células (multiplicam-se até três vezes, por dia), obtêm-se respostas crônicas utilizando este organismo-teste, uma vez que diferentes gerações sofrem exposição. Os resultados podem ser expressos como CENO (concentração inicial de efeito não observado), CEO (concentração inicial de efeito observado), VC (valor crônico), Clp (concentração inicial de inibição) e FT (KNIE; LOPES, 2004; ABNT, 2018).

### 3.5.3 Genotoxicidade com *Daphnia magna* através do ensaio Cometa

Avaliações ecotoxicológicas mais sensíveis, como os ensaios de genotoxicidade, possibilitam respostas precoces quanto ao efeito nocivo de um ou mistura de xenobióticos, avaliando o potencial genotóxico de substância(s) química(s). Logo, os biomarcadores genéticos visam avaliar a alteração da estrutura da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), formação de micronúcleos, anormalidades morfológicas nucleares, dentre outros danos genéticos, causadas pela exposição de doses subletais do agente nocivo, possibilitando inferir que baixas concentrações são passíveis de gerar alterações cromossômicas pré-mutagênicas, capazes de resultar em lesões de tecidos e órgãos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; DAVID et al., 2011; RAMSDORF, 2011; PARRELLA et al., 2015).

Dentre os biomarcadores genéticos, têm-se o ensaio cometa ou eletroforese em gel, que avalia e quantifica os danos causados ao material genético através da análise de células individuais (nucleóides), o que requer etapas de desintegração

incapazes de danificar o material celular e que resultem em células únicas (COLLINS, 2004; RAMSDORF, 2011).

O ensaio cometa pode ser realizado com qualquer célula, desde que nucleada, e baseia-se no princípio de que as células sem dano genético apresentam fluxo migratório homogêneo após a indução da migração eletroforética e, assim, há a concentração do material genético da célula em um único ponto. A partir do momento em se tem fragmentos ocasionados pela quebra da fita de DNA, a migração deixa de ser uniforme e cada fração genética migra com velocidade distinta, sendo que os fragmentos maiores são mais vagarosos em comparação com fragmentos menores, o que dá origem a uma cauda que se assemelha a um cometa (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009; RAMSDORF, 2011).

Os danos genéticos são classificados através da extensão da cauda formada após a corrida eletroforética visto que, quanto maior for o número de fragmentos genéticos, maior será o prolongamento advindo da migração dessemelhante, o que possibilita inferir que maior é o potencial genotóxico da substância (SINGH et al., 1988; BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009).

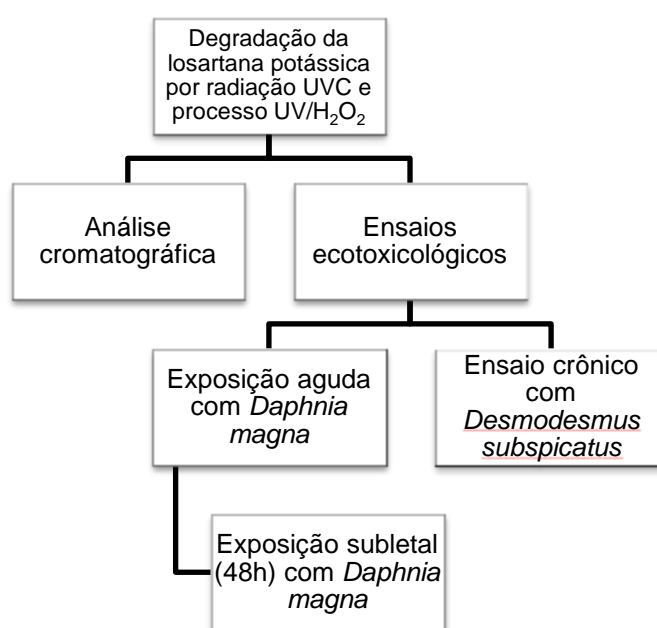
O ensaio cometa é uma técnica sensível na detecção de quebras do DNA, não é oneroso e de rápida execução. Os organismos-teste normalmente utilizados incluem peixes, anfíbios e moluscos, contudo, há diversos estudos empregando o microcrustáceo *D. magna* para a avaliação genotóxica de xenobióticos (PARK; CHOI, 2007; LEE; KIM; CHOI, 2009; DAVID et al., 2011; PELLEGRINI; GORBI; BUSCHINI, 2014; PARRELLA et al., 2015; KNAPIK, 2018).

O uso de *D. magna*, por ser um organismo sensível a diversos compostos químicos e representativo na cadeia alimentar (consumidor primário), permite obter informações relevantes e precoces quanto a genotoxicidade de compostos químicos disponíveis em ambientes aquáticos. Além disso, é possível elucidar possíveis mecanismos de ação de substâncias genotóxicas em invertebrados, o que não é muito compreendido (PARK; CHOI, 2007; WATANABE et al., 2007; BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009; DAVID et al., 2011).

## 4 METODOLOGIA

O procedimento experimental foi dividido em três etapas que incluíram: degradação do fármaco, caracterização cromatográfica e ensaios ecotoxicológicos, cuja sequência está representada na figura 7.

Figura 7. Fluxograma dos procedimentos a serem executados.



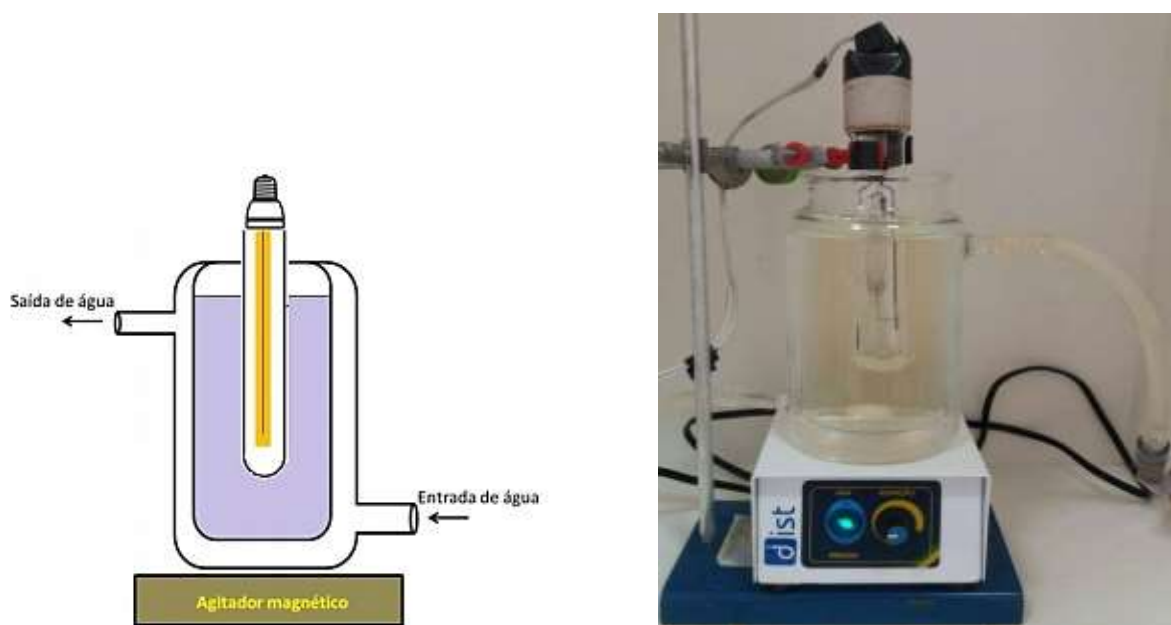
Fonte: Autoria própria

### 4.1 DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO LOSARTANA POTÁSSICA POR RADIAÇÃO UVC E PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A concentração de estudo de losartana potássica (Marca: Delaware, Fabricante: Aurobindo Pharma, Hyderabad - Índia, com pureza de 99%) foi igual a 2,5 mg L<sup>-1</sup> (6 µM), definida de acordo com o encontrado por Larsson, Pedro e Paxeus (2007) para o efluente da ETDI Patancheru Enviro Tech Ltd, localizada em Patancheru (Índia). As soluções de losartana potássica foram preparadas com água processada (sistema de osmose reversa).

A fotólise por radiação UVC, assim como o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado em um reator de bancada de vidro borossilicato com capacidade de 600 mL, equipado com recirculação de água para resfriamento e agitação magnética. A radiação foi fornecida por uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão (125 W), protegida por um bulbo de quartzo e imersa na solução (Figura 8). Em ambos os processos foram retiradas alíquotas no tempo inicial e após 30, 60, 90, 120, 240 e 480 minutos de tratamento, que foram acondicionadas em freezer -20 °C para os posteriores ensaios ecotoxicológicos e, também, análise cromatográfica.

**Figura 8. Reator fotoquímico utilizado nos processos avançados de oxidação.**



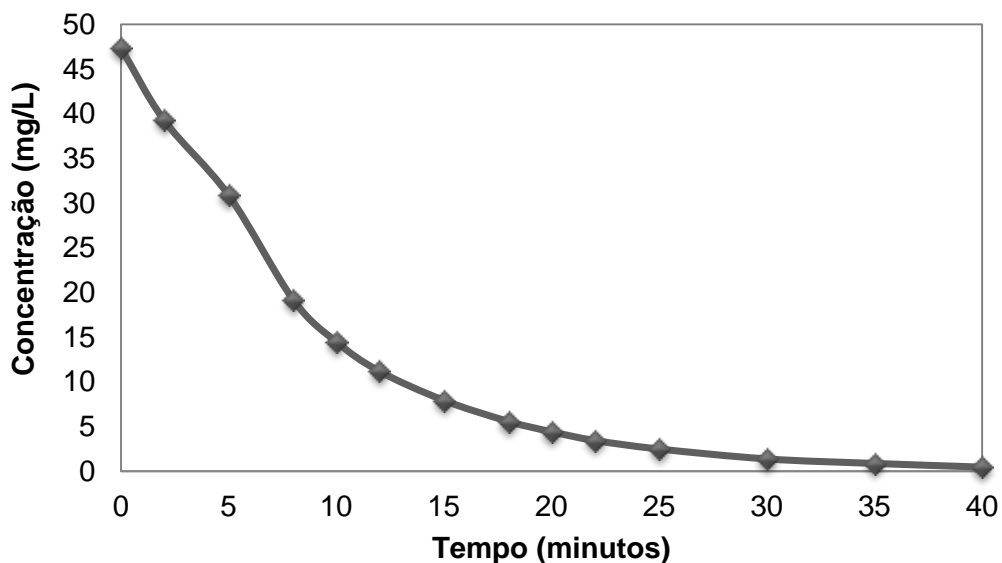
Fonte: (à esquerda) adaptado de UTZIG, 2016. (à direita) Autoria própria.

De acordo com Yuan et al. (2009 e 2011) e Starling et al (2017), a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada para degradar antibióticos e fármacos, como a losartana potássica, foi de 1mM, sendo a relação entre a concentração do agente oxidante e a substância farmacêutica de 20:1. Desta forma, a concentração inicial de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) definida para o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi de 50 mg L<sup>-1</sup> (1,5 mM).

Para manter o processo avançado de oxidação, foi realizada a análise do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para estipular o tempo de novas adições. Para isso, as mesmas condições de degradação do fármaco foram simuladas, porém, sem o desligamento

da lâmpada de vapor de mercúrio. Através da Figura 9, observa-se a depleção significativa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  após meia hora de reação, portanto, o tempo definido para as reações foi de 30 minutos.

Figura 9. Consumo de peróxido de hidrogênio em função do tempo.



Fonte: Autoria própria

As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram determinadas através do método espectrofotométrico utilizando reagente Allper® (Peróxidos do Brasil), cuja composição inclui oxalato de potássio de titânio ( $\text{C}_4\text{K}_2\text{O}_9\text{Ti}$ ) e ácido sulfúrico. Na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , há a formação do complexo peróxido de titânio (IV) de coloração alaranjada, absorvendo radiação eletromagnética na região do visível. A quantidade de peróxido residual é diretamente proporcional à formação do complexo, o que influencia no valor de absorbância (LEWIS, 1958; UTZIG, 2016). A análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Varian Cary® 50 Bio), em comprimento de onda de 395 nm. A quantificação foi realizada por intermédio de uma curva analítica.

Para evitar resultados ecotoxicológicos superestimados das amostras tratadas por processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , houve a correção do pH para  $\cong 7$  utilizando solução de NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . O peróxido residual foi removido usando solução de catalase de fígado bovino em concentração de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich).

## 4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O estudo da degradação da losartana potássica foi obtido pela concentração determinada através de cromatografia líquida. Para isso, utilizou-se cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu) acoplado a um detector de arranjo de diodos. Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau HPLC (Sigma-Aldrich) e água de qualidade ultrapura (tipo 1).

Utilizou-se coluna analítica (Hypersyl ODS, 150 x 46 mm d.i., 5 µm de diâmetro de partícula) e fase móvel composta por 37 % de solução aquosa de ácido ortofosfórico 0,1 % (v/v) e 63 % de metanol em eluição de forma isocrática. A vazão de fase móvel foi de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e a coluna foi mantida em temperatura de 30 °C, sendo o volume de injeção de 50 µL. Para a detecção e quantificação do analito e subprodutos, o comprimento de onda monitorado foi de 254 nm (REQUE, 2017).

A curva analítica foi elaborada por calibração externa, com concentrações partindo da diluição de solução estoque de 2500 mg L<sup>-1</sup> de losartana potássica (Marca: Delaware, Fabricante: Aurobindo Pharma, Hyderabad - Índia, com pureza de 99%) para a obtenção das seguintes concentrações: 7,5; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,001 mg L<sup>-1</sup>.

A partir dos valores de área do pico cromatográfico, em triplicata para cada concentração, calculou-se a regressão linear e foram obtidos os desvios padrão dos coeficientes linear e angular. A análise estatística dos resíduos da regressão foi feita pelo Teste-F, sendo aplicado a análise de variância (ANOVA) para obtenção de  $F_{\text{Calculado}}$ , cujo calculo é feito pela Equação 5.

$$F_{\text{Calculado}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:  $S_1^2$  é o desvio padrão máximo de uma população independente e  $S_2^2$  o desvio padrão mínimo de uma população independente (BRASIL, 2011). O critério de aceitação para que os dados fossem considerados lineares e a possibilidade do uso da regressão linear válida, é de que  $F_{\text{calculado}} \geq \text{valor-p}$  (CARDOSO et al., 2010).

Através da curva analítica foi possível definir figuras de mérito como: linearidade (coeficiente de correlação ou  $r$ ), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), sendo estes dois últimos calculados pelas equações 6 e 7. O intervalo linear de trabalho, obtido através da curva analítica, também foi definido. Para o valor de LQ, inicialmente foram feitas análises em concentrações decrescentes e foi considerada aquela que, o valor de CV estava abaixo de  $\leq 20\%$  (BRASIL, 2011); a partir da curva analítica, elaborada a partir dessa concentração ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ ) estabeleceu-se o valor definitivo conforme equação 7.

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão do coeficiente linear} \times 3}{\text{coeficiente angular}} \quad (\text{Equação 6})$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão do coeficiente linear} \times 10}{\text{coeficiente angular}} \quad (\text{Equação 7})$$

A losartana potássica sem tratamento e após degradação por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi analisada por injeção direta no sistema cromatográfico e, para as amostras que não se observou pico do fármaco, foi realizado o procedimento de extração em fase sólida por SPE (Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*). As amostras que precisaram da etapa de concentração foram os tempos de 90, 120, 240 e 480 minutos de ambos os tratamentos e 60 minutos da degradação por fotólise.

O procedimento de SPE foi realizado em *manifold* a vácuo (Agilent Technologies), sendo utilizados cartuchos com capacidade de 6 mL, recheados com 500 mg de fase estacionária C18 (Chromabond®). Para o condicionamento da fase estacionária, foram utilizados 10 mL de metanol (Sigma-Aldrich, 99,9 %) e 10 mL de água ultrapura. Após isso, foram adicionados 20 mL de amostra, o cartucho foi submetido à secagem sob vácuo por 120 s e os analitos retidos foram eluídos com 10 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas em ar comprimido e redissolvidas com 0,5 mL de solução 1:1 de metanol e água ultrapura, dos quais 50  $\mu\text{L}$  foram injetados no sistema cromatográfico. Esse procedimento de extração representa um fator de concentração de 40 vezes (LANÇAS, 2009).



As análises cromatográficas, descritas nesta seção, foram realizadas no Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA), pelo aluno Bruno Blaszczyk Neves, capacitado para operar o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-DAD).

#### 4.3 ECOTOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO *Daphnia magna*

O cultivo de *Daphnia magna* seguiu a NBR 12713:2016 (ABNT, 2016). Os organismos foram mantidos em béqueres de 2 L, utilizando meio de cultivo (ANEXO A) e acondicionados em incubadoras B.O.D. (Solab, SL-224) com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura entre 18 a 22 °C, sendo alimentados com suspensão algácea da espécie *Desmodesmus subspicatus*.

Foram realizados testes de sensibilidade antes e durante os ensaios com amostras de losartana potássica, possibilitando a construção da carta-controle (APÊNDICE A). Para isso, utilizou-se sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) (Synth, P.A) como substância de referência. Através da solução-mãe de  $ZnSO_4$  com concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , foram feitas diluições com as seguintes concentrações: 5, 20, 35, 50, 65, 80 e  $95 \text{ mg L}^{-1}$ , obtendo-se o valor de  $CE_{50/24h}$  através do método Probitos com auxílio do *software* BioStat®. O valor de coeficiente de variação foi de 8,02 %, estando de acordo com a norma, que estabelece coeficiente de variação menor que 30 % (ABNT, 2016).

Para todas as amostras provenientes do tratamento por fotólise e UV/ $H_2O_2$ , foram feitas diluições utilizando água de diluição (ANEXO A), gerando soluções-teste com as seguintes concentrações (percentual de amostra em 100 mL de solução): 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 %. Desta forma, a toxicidade das amostras pré e pós-tratadas foram determinadas através do fator de toxicidade (FT), cujos valores variaram de 1 até 32, que corresponde as soluções-teste com 100 % e 3,125 % de volume da amostra, respectivamente (ABNT, 2016).

Após o preparo das soluções-teste, foi realizada a exposição dos neonatos de *D. magna*. Para isso, foram separados das matrizes os organismos-teste de até 24 horas de vida. Após isso, esperou-se cerca de 2 horas para iniciar o bioensaio, facilitando a observação de neonatos impróprios, sendo selecionados apenas os

organismos aptos, ou seja, com capacidade natatória adequada (KNIE, LOPES, 2004). Os ensaios foram feitos em triplicata utilizando 10 neonatos para cada 20 mL de solução em cada replicata (2 mL por organismo). Os ensaios foram mantidos em uma incubadora B.O.D (Solab, SL 200/334), com temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  na ausência de luz. Todos os ensaios tiveram um controle negativo, sendo os neonatos mantidos nas mesmas condições de ensaio e em apenas água de diluição, sendo o bioensaio considerado válido apenas quando a porcentagem de inibição do controle fosse  $\leq 10\%$  (ABNT, 2016).

A leitura do resultado do ensaio foi realizada após 48 horas de exposição, contabilizando os organismos imóveis para obtenção do percentual de imobilidade e, por conseguinte, o FT.

#### 4.4 ECOTOXICIDADE CRÔNICA UTILIZANDO *Desmodesmus subspicatus*

O cultivo e bioensaios com a microalga *Desmodesmus subspicatus* foram realizados de acordo com o descrito pela norma técnica NBR 12648:2018 (ABNT, 2018), com alteração do volume final das soluções-teste, que foi de 50 mL ao invés de 100 mL.

Para os ensaios, realizou-se o pré-cultivo da microalga em meio DIN pré-cultura (ANEXO B). As soluções-teste, preparadas em erlenmeyers após três dias a partir da inoculação da pré-cultura, foram constituídas de meio DIN (ANEXO B) e suspensão algácea (inóculo com densidade celular entre  $10^3$  a  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), ambos representando 10 % da composição da solução, além da amostra e água processada (sistema de osmose reversa), em proporções variadas de acordo com a Tabela 2 (ABNT, 2018).

**Tabela 2. Proporções utilizadas de suspensão algácea (inóculo), DIN, água e amostra para cada solução-teste.**

Concentração (%)	FT	Inóculo (mL)	DIN (mL)	Água processada (mL)	Amostra (mL)	Volume Final (mL)
80	1,25	5	5	0	40	50
50	2	5	5	15	25	50
25	4	5	5	27,5	12,5	50
12,5	8	5	5	33,75	6,25	50
6,25	16	5	5	36,88	3,125	50
3,125	32	5	5	38,44	1,56	50
Controle	-	5	5	40	-	50

Fonte: ABNT NBR 12648:2018

Os ensaios foram feitos em triplicata e o tempo de exposição foi de 72 horas com iluminação ininterrupta e agitação de  $145 \text{ g min}^{-1}$ , realizada em mesa agitadora horizontal (Tecnal, TE – 1400). A temperatura do ensaio foi mantida em torno de  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo o monitoramento feito por termômetro. Os erlenmeyers foram vedados e dispostos aleatoriamente na mesa agitadora, evitando possíveis interferências nos resultados por diferença de luminosidade e/ou temperatura.

A leitura dos resultados de biomassa algácea, inicial e final em cada ensaio, foi realizada de forma indireta através do método espectrofotométrico. Para as análises foi utilizado leitor de microplacas (BMG Labtech, FluoStar Omega) em comprimento de onda de 750 nm. Para a leitura, utilizou-se microplaca de 96 poços (Olen, K30-5096P), sendo adicionados  $250 \mu\text{L}$  da solução-teste em cada poço. A leitura da biomassa algácea de cada solução-teste foi feita em quadruplicata, ou seja, quatro poços foram analisados para a mesma réplica, sendo tirada a média de 12 poços para obtenção da densidade celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ) para cada concentração da amostra.

A relação entre densidade celular e absorvância luminosa foi possível por intermédio de uma curva analítica (APÊNDICE B), elaborada pelo mestrando Vinícius de Carvalho Soares de Paula. A partir dos valores de densidade celular para cada solução-teste, foi possível calcular a porcentagem de inibição do aumento da biomassa algácea, sendo empregada a Equação 8 (ABNT, 2018).

$$\text{ICA} = \frac{M_c - M_a}{M_c} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

A porcentagem de inibição do crescimento algáceo, ICA, é igual à subtração da média do número de células do controle ( $M_c$ ) e da média do número de células da solução-teste ( $M_a$ ), sendo dividido por  $M_c$  e multiplicado por 100 (porcentagem). Os resultados, expressos em FT para cada amostra, foram atribuídos para a maior concentração em que não houve porcentagem de inibição algácea maior que 20 %.

#### 4.5 ENSAIO COMETA UTILIZANDO *Daphnia magna*

O ensaio para avaliar os danos genotóxicos gerados ao organismo-teste *D. magna* foi realizado com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) com adaptações a fim de viabilizar a utilização deste organismo-teste no ensaio cometa (PARK; CHOI, 2007; DAVID et al., 2011; PARRELLA et al., 2015; KNAPIK, 2018).

Os neonatos foram expostos a concentrações subletais de losartana potássica ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) sem tratamento e após 480 minutos de degradação por fotólise e processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , propiciando a comparação da genotoxicidade do fármaco antes e após o tempo final de tratamento. Foi exposto um grupo controle, mantidos nas mesmas condições de ensaio, em água de diluição (controle negativo).

A exposição dos organismos-teste foi de 48 horas e, após isso, 30 neonatos foram coletados e lavados com tampão PBS pH 7,4, sendo transferidos para um eppendorf contendo 200  $\mu\text{L}$  deste mesmo tampão. Utilizando um homogeneizador rotativo de tecidos (Ultra Stirrer, ultra 80), os neonatos foram homogeneizados na menor velocidade e com o máximo de três pulsos, evitando resultados falsos por danos celulares indevidos (KNAPIK, 2018).

Obtendo-se a suspensão celular, as etapas subsequentes foram realizadas sem incidência de luz branca. Em novos eppendorfs, foram transferidos 30  $\mu\text{L}$  da suspensão celular e 80  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão (KNAPIK, 2018). A mistura resultante foi transferida para uma lâmina, previamente recoberta por agarose normal, e espalhada por uma lamínula. Em seguida, acondicionou-se em refrigerador por 20 minutos, para solidificação da agarose de baixo ponto de fusão.

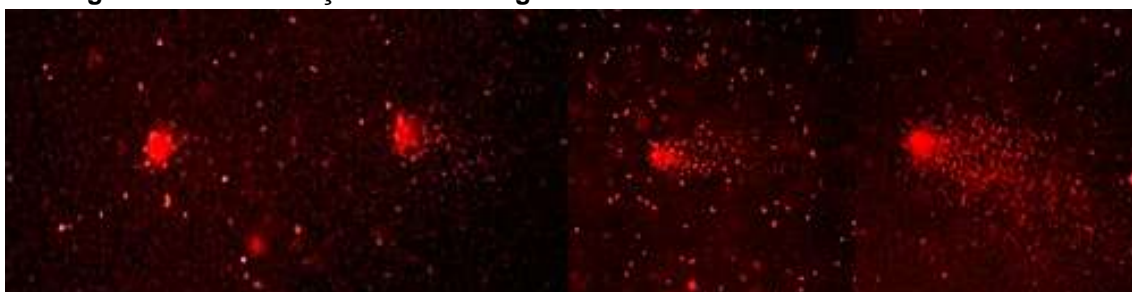
Transcorrido o intervalo de tempo em geladeira, retirou-se as lamínulas e as lâminas foram mantidas em cubetas por sete dias em uma solução de lise alcalina, sendo o armazenamento e acondicionamento feito em refrigerador ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

A etapa seguinte foi a realização da eletroforese. Para isso, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese de modo a ocupar todo o espaço disponível, sendo mantida a cuba em gelo para preservar a temperatura em 4 °C. Adicionou-se tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 200 mM) de forma que todas as lâminas foram imersas nesta solução. Houve o ajuste de tensão e corrente para 25 V e 300 mA, respectivamente, sendo mantido o sistema em repouso por 30 minutos para desnaturação do DNA. Subsequente, prosseguiu-se a eletroforese com a cuba em gelo por 25 minutos, nas mesmas condições de tensão elétrica e corrente mencionadas (KNAPIK, 2018).

O término da eletroforese sucedeu a etapa de neutralização das lâminas com solução TRIS 0,4 mol L<sup>-1</sup>, por cinco minutos. As lâminas foram secas e fixadas com etanol.

A coloração do material genético deu-se com 20 µL de brometo de etídio e, ao ser adicionado, houve a cobertura com lamínula. Utilizando um microscópio de epifluorescência (Leica DMLS) com aumento de 400x, foram realizadas as análises e atribuição dos escores para os nucleóides presentes na lâmina. Os danos foram classificados de 0 a 3, sendo o dano classificado como 0 aquele em que não houve dano no DNA, já o dano 1 quando se observou poucos fragmentos. O escore 2 foi atribuído ao nucleóide em que houve o início da formação da cauda de fragmentos de DNA, enquanto que no escore 3 o DNA apresentou-se completamente fragmentado. Tais classificações de danos genéticos podem ser melhor compreendido por meio da Figura 10.

**Figura 10. Classificação dos danos genéticos obtidos através do ensaio cometa.**



**Legenda: (da esquerda para a direita) Dano 0, 1, 2 e 3.**

**Fonte: Autoria própria**

A partir da classificação visual dos danos, foi aplicada a Equação 9 para o cálculo dos escores dos nucleóides analisados em cada lâmina, sendo contabilizados e atribuídos danos para 100 nucleóides presentes em uma lâmina (PARRELLA et al., 2015; KNAPIK, 2018). Ao todo, foram avaliadas nove lâminas para cada amostra.

$$\text{Escore} = (\sum \text{danos } 0 \times 0) + (\sum \text{danos } 1 \times 1) + (\sum \text{danos } 2 \times 2) + (\sum \text{danos } 3 \times 3) \quad (9)$$

O cálculo do escore permitiu a obtenção da mediana e construção do gráfico box-plot dos escores para a losartana sem e após tratamento, possibilitando visualizar os danos genotóxicos das amostras isoladamente e em comparação com os demais grupos. Para a análise estatística, foi verificada a normalidade por teste de Shapiro-Wilk e Anderson-Darling, ambos indicaram que os dados não possuem distribuição normal. Desta forma, aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, adotando nível de significância de 5 %. Para isso, foi utilizado o *software* Graphpad Prism 5.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

#### 5.1.1 Curva analítica

A análise quantitativa de losartana potássica, anterior e posterior aos tratamentos, foi realizada através de regressão linear obtida por calibração externa. Os valores crescentes de concentração e respectivos dados de área de pico, média, desvio padrão e CV encontram-se na Tabela 3. Observa-se que os valores, em triplicata, de área do pico cromatográfico não variaram significativamente, havendo concordância entre os resultados. Há o aumento dos valores de CV conforme diminui a concentração, visto que há a aproximação do limite de quantificação, entretanto dentro do limite aceitável de variabilidade (20%). Portanto, o intervalo linear estabelecido para o método foi de 0,025 a 7,5 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 3. Dados de concentração, áreas do pico cromatográfico, desvio padrão e CV para os pontos selecionados para construção da curva analítica.**

Losartana (mg L <sup>-1</sup> )	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Média	Desvio Padrão	CV (%)
0,025	1158	1855	1815	1632	1615	319,8	19,80
0,250	19827	24464	24499	-	22930	2687,3	11,72
1,000	95970	95828	100979	-	97592,3	2933,8	3,01
2,500	262859	255662	264007	260511	260760	3696,9	1,42
5,000	530714	554219	535681	-	540205	12388,3	2,29
7,500	788880	792749	778022	-	786550	7634,9	0,97

**Nota. CV: coeficiente de variação. Condições cromatográficas: coluna Hypersyl ODS; λ: 254 nm; Fase móvel (FM): MeOH H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: (63:37); Volume de injeção: 50 µL; Vazão da FM: 0,5 mL min<sup>-1</sup>**

A regressão linear obtida a partir dos valores de área da banda correspondente à losartana e os valores de coeficiente angular e linear, assim como

seus respectivos desvios-padrão encontram-se da Figura 11(a) e na Tabela 4. O valor de  $r$ , igual a 0,9992, evidência a boa linearidade do método de análise, visto que está acima do definido para a aceitação da linearidade, que deve ser  $\geq 0,990 - 0,995$  (ANVISA, 2009; BRASIL, 2011). Através do tratamento estatístico ANOVA, obteve-se os valores de grau de liberdade (G.L), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM),  $F_{\text{calculado}}$  e valor-p, apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Dados de regressão da curva analítica e análise estatística (ANOVA) para o método analítico de quantificação de losartana potássica por HPLC-DAD.**

	<b>Coeficiente</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Intercepto</b>	-3055,092	2555,2245	0,247
<b>Inclinação</b>	106181,75	692,964	1,686E-29

<b>ANOVA</b>					
	<b>G. L</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b><math>F_{\text{calculado}}</math></b>	<b>Valor-p</b>
<b>Regressão</b>	1	1,580E+12	1,580E+12	23478,902	1,685E-29
<b>Resíduo</b>	18	12310958147	67275451,6	-	-
<b>Total</b>	19	1,581E+12	-	-	-

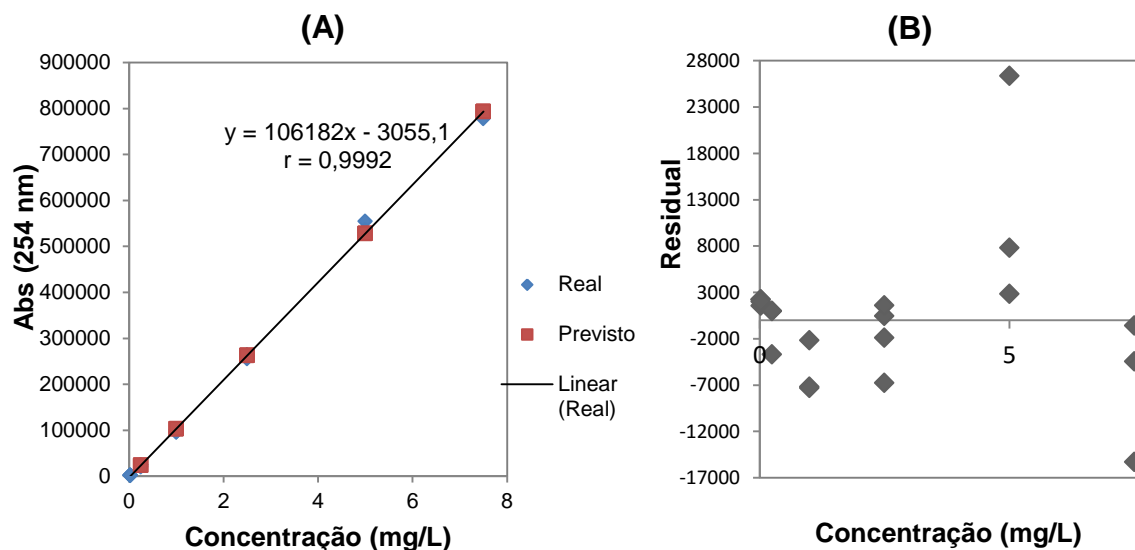
**Nota: GL= grau de liberdade. SQ= Soma dos Quadrados. QM= Quadrado Médio.**

Considerando a premissa de que  $F_{\text{Calculado}}$  deve ser  $\geq$  que o valor-p para que a regressão linear seja considerada, observa-se que os dados satisfazem este critério (CARDOSO et al., 2010).

O limite de quantificação, calculado pela substituição de  $y = 0$  na equação da reta, foi de  $0,0287 \text{ mg L}^{-1}$ . Já pelo cálculo através da equação 7, este valor seria de  $0,241 \text{ mg L}^{-1}$ . O limite de detecção, calculado pela Equação 6, foi de  $0,072 \text{ mg L}^{-1}$ .



Figura 11. (A) Representação gráfica e regressão linear para quantificação de losartana potássica. (B) Gráfico de dispersão dos resíduos da regressão linear



A análise da dispersão de resíduos (Figura 11b) indica a homogeneidade das variâncias, havendo comportamento aleatório ao redor de zero para a faixa de concentração analisada (descrito na seção 4.2). Desta forma, conclui-se que é possível aplicar a regressão linear obtida para determinar as concentrações em função das áreas (BRASIL, 2011).

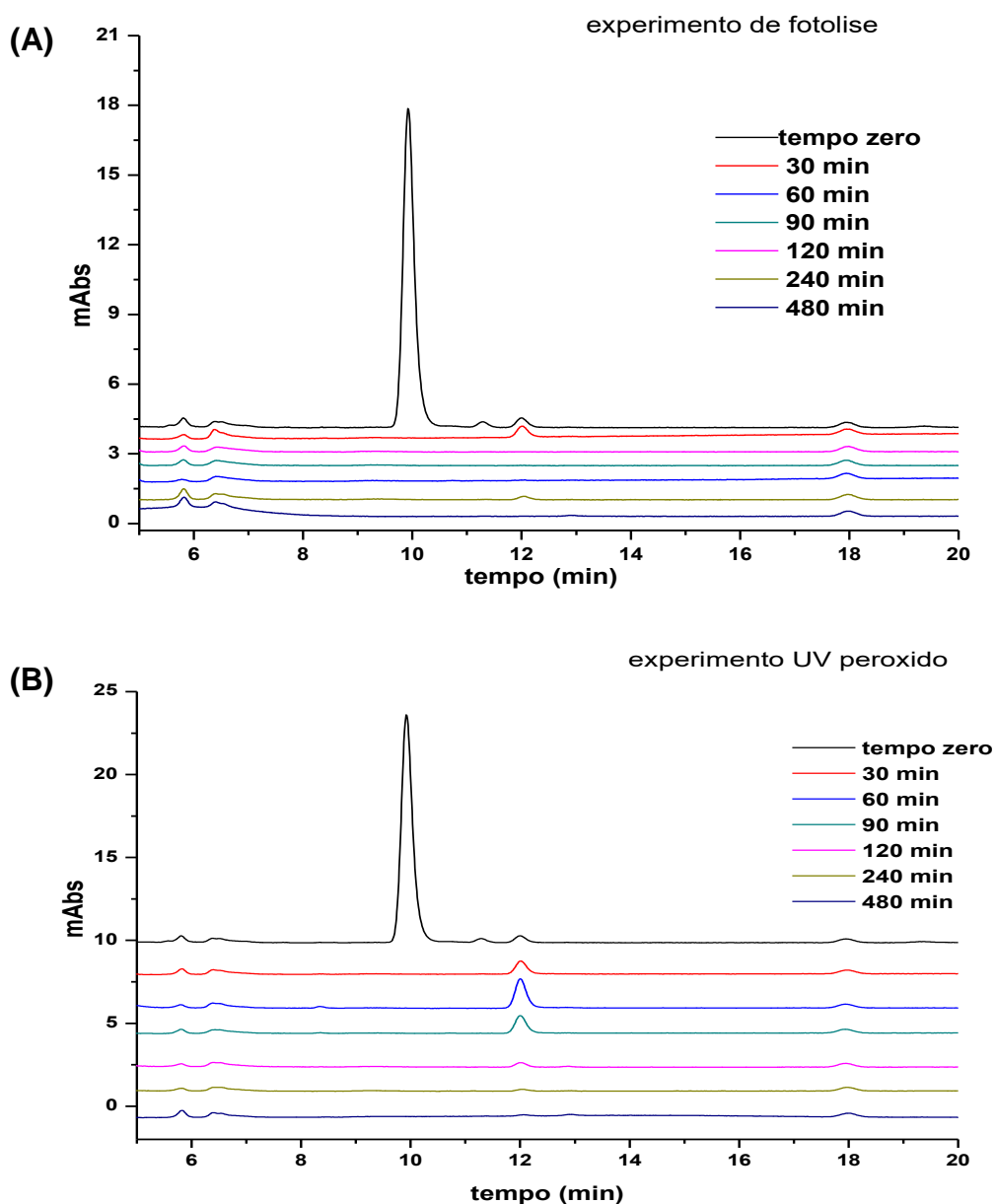
### 5.1.2 Avaliação da degradação de losartana potássica por HPLC-DAD

Para avaliar a degradação de losartana potássica, após fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as análises de HPLC-DAD possibilitaram a identificação e quantificação deste fármaco nas amostras sem e após tratamento. O tempo de retenção de losartana potássica, nas condições cromatográficas de análise, foi de 10 minutos.

Ao ser submetido ao tratamento por fotólise, observa-se a completa degradação de losartana potássica após 30 minutos de degradação (Figura 12a), igualmente para o tratamento por processo avançado de oxidação (Figura 12b). Entretanto, a geração de subproduto, com tempo de retenção de 12 minutos, é observada para ambos os tratamentos. Para o tratamento por fotólise, até

30 minutos de degradação há a presença deste subproduto, que passa a ser detectado novamente em 240 minutos. Para o processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é constatado o decréscimo deste subproduto conforme os tempos de tratamento, que passa não ser mais detectado em 480 minutos.

Figura 12. (A) Cromatograma de losartana potássica sem e após tratamento por radiação UVC e (B) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Nota: Condições cromatográficas: coluna Hypersyl ODS;  $\lambda$ : 254 nm; Fase móvel (FM): MeOH H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: (63:37); Volume de injeção: 50  $\mu$ L; Vazão da FM: 0,5 mL min<sup>-1</sup>

Os resultados estão de acordo com a literatura (ALI et al., 2017; STARLING et al., 2019), havendo completa degradação a partir de 30 minutos, de ambos os tratamentos. A estrutura de losartana potássica é susceptível a degradação por fotólise devido grupamentos capazes de absorver fótons, como anéis aromáticos, ligações insaturadas, grupamentos contendo nitrogênio (por exemplo, o imidazol) (STARLING et al., 2019).

A partir da curva analítica, quantificou-se o valor de  $1,94 \text{ mg L}^{-1}$  para o tempo zero, sendo possível observar outro de pico de menor intensidade em 12 minutos, referente ao subproduto de degradação também presente nas amostras após os tratamentos, indicando a decomposição do fármaco sem ação da radiação e/ou agente oxidante. Fatores como exposição à luz na etapa do preparo da solução e nas análises cromatográficas podem justificar esta degradação inicial.

As amostras que não foram detectados picos cromatográficos referentes à losartana e ao subproduto de degradação, foram submetidas à etapa de pré-concentração de 40 vezes por extração de fase sólida (SPE), a fim de confirmar ou não a ausência de losartana e demais compostos na amostra. Neste sentido, as amostras a partir de 60 minutos de degradação por fotólise e, para o processo oxidativo avançado, desde 90 minutos, foram fortificadas.

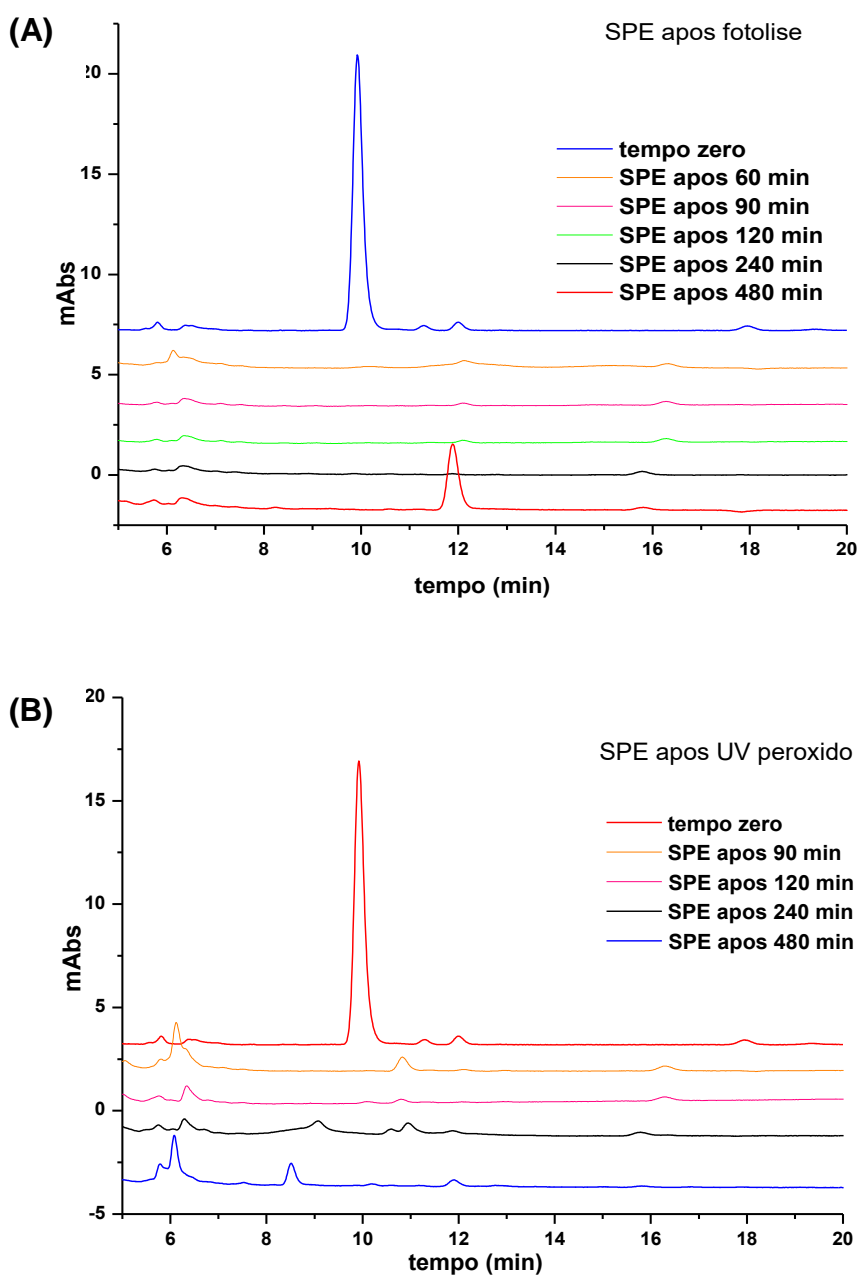
A Figura 13 apresenta os cromatogramas referentes às análises das amostras, após SPE, para os tratamentos por fotólise (Figura 13a) e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 13b). Apenas para a degradação de 480 minutos por fotólise foi detectada a presença do subproduto de degradação após a etapa de pré-concentração.

Constata-se que o tratamento por processo oxidativo avançado UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formou outros subprodutos de degradação, além daquele com eluição em 12 minutos de análise. Para a degradação de 90 minutos, observam-se substâncias com tempo de retenção de 6 e 11 minutos. Para o tratamento de 240 minutos, há picos de baixa intensidade entre 6 e 7 minutos de análise cromatográfica, bem como em 9 e 11 minutos. Já para a degradação de 480 minutos, há subprodutos detectados e eluídos em 6; 8,5 e 12 minutos de análise.

Segundo YUAN et al. (2009), substâncias farmacêuticas podem gerar intermediários como ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, ácido para-hidroxibenzoico, ácido 1,4-benzenodicarboxílico, entre outros. Devido à presença de cloro e nitrogênio na estrutura, é possível formar compostos clorados e íon cianeto a partir da degradação de losartana potássica por AOP (STARLING et al., 2019).

Essas substâncias podem ser capazes de gerar efeitos agudos, crônicos e/ou genotóxicos, apesar de estarem em pequena quantidade (levando em conta o baixo sinal do pico cromatográfico).

Figura 13. (A) Cromatograma de losartana potássica após SPE de amostras tratadas por 60, 90, 120, 240 e 480 minutos através de fotólise e (B) 90, 120, 240 e 480 minutos através de processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Nota: Condições cromatográficas: coluna Hypersyl ODS;  $\lambda$ : 254 nm; Fase móvel (FM): MeOH H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: (63:37); Volume de injeção: 50  $\mu$ L; Vazão da FM: 0,5 mL min<sup>-1</sup>

## 5.2 ECOTOXICIDADE AGUDA DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA *Daphnia magna*, APÓS FOTÓLISE E PROCESSO UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A imobilidade média do ensaio agudo para *Daphnia magna* exposta à losartana potássica, antes e após tratamento por fotólise, apresenta-se na Tabela 5. Em sua forma inalterada, ou seja, no tempo zero de tratamento, ainda havia efeito agudo aos organismos-teste no fator de diluição (FD) de 50 %, sendo a imobilidade média de 13,33 %. Para o tratamento por fotólise, a partir de 30 minutos de degradação observou-se efeito agudo apenas para as amostras sem diluição, ou seja, FD de 100 %, sendo o tempo de 240 minutos de tratamento o mais eficiente na redução da ecotoxicidade aguda do fármaco losartana potássica, visto que a amostra apresentou imobilidade média de apenas 20 % em FD de 100 %.

Para as amostras tratadas através de fotólise por 90, 120 e 480 minutos, observaram-se os maiores valores de imobilidade média em FD de 100 %. Há a possibilidade de estas amostras terem provocado efeito hormese, ou seja, apesar da presença de intermediários em concentrações ínfimas, não detectáveis pelo método cromatográfico empregado, podem ter sido capazes de gerar efeito agudo para *D. magna*, visto que na hormese não há relação linear entre a dose de exposição e a resposta do organismo-teste. Algumas substâncias farmacêuticas apresentam este comportamento, visto que são compostos ativos e podem causar estresse celular, resultando em respostas de adaptação (CALABRESE, 2008; ALMEIDA et al., 2013).

Os resultados estão coerentes com a análise cromatográfica (Figuras 12a) uma vez que, a partir de meia hora de degradação, houve a completa degradação de losartana potássica por fotólise.

**Tabela 5. Imobilidade média (%) para *D. magna* exposta a diferentes fatores de diluição de losartana potássica não tratada e após intervalos de tempo de tratamento por fotólise.**

(continua)

Tempo de tratamento (min)	Imobilidade média (%)							$\sigma$ (%)	CV (%)
	CT	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%		
0	0	0	0	0	0	13,33	76,67	2,83	1,89
30	0	0	0	0	0	0	66,67	2,58	2,32

Nota. CT: controle negativo.  $\sigma$ : desvio padrão populacional. CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 5. Imobilidade média (%) para *D. magna* exposta a diferentes fatores de diluição de losartana potássica não tratada e após intervalos de tempo de tratamento por fotólise.

Tempo de tratamento (min)	Imobilidade média (%)							(conclusão)	
	CT	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%	$\sigma$ (%)	CV (%)
60	0	0	0	0	0	0	63,33	2,41	2,29
90	0	0	0	0	0	0	100	3,73	2,24
120	0	0	0	0	0	0	80	2,98	2,24
240	0	0	0	0	0	0	20	1,00	3,00
480	0	0	0	0	0	0	93,33	3,48	2,24

Nota. CT: controle negativo.  $\sigma$ : desvio padrão populacional. CV: coeficiente de variação.  
Fonte: Autoria própria.

Para o tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os valores de imobilidade média estão dispostos na Tabela 6. Para 30 minutos de tratamento, foi observado efeito agudo para *D. magna* em FD de 50 %, contudo, houve a redução da ecotoxicidade em comparação com o fármaco na sua forma inalterada para esta mesma concentração de amostra, visto que a imobilidade média passou de 13,33 % para 6,67 %. A partir de 60 minutos de degradação, houve inibição da capacidade natatória apenas para as amostras sem diluição (FD = 100 %), exceto para a amostra de 240 minutos de degradação, que foi tóxica para *D. magna*. A presença de subprodutos de degradação no tempo de 240 minutos, detectados pelo método cromatográfico após pré-concentração de 40 vezes (Figura 13b), podem ter potencializado o efeito agudo até na menor concentração de solução-teste, ou seja, FD de 3,125 %.

No tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de compostos orgânicos contendo ligações  $\pi$ , como é o caso dos hidrocarbonetos insaturados e anéis aromáticos, estes são capazes de sofrer hidroxilação, ou seja, há a adição do grupo hidroxila na molécula (MELO et al., 2009). Segundo Carpinteiro et al. (2019), a hidroxilação da losartana potássica, assim como a desalquilação e abertura do imidazol são capazes de gerar subprodutos tóxicos para *Daphnia magna*. Os valores de CE<sub>50/48h</sub> *in silico* para *D. magna*, estimada para os subprodutos de losartana através do software ECOSAR (desenvolvido pela *Environmental Protection Agency* (EPA)), variaram de 8 até 0,008 mg L<sup>-1</sup>, sendo este último muito tóxico para o microcrustáceo. Através do

resultado *in vivo* com *D. magna*, para o tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 240 minutos, há a concordância com os resultados *in silico*.

Os tratamentos de 60 e 90 minutos por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram eficientes para a redução da ecotoxicidade do fármaco, visto que a maior imobilidade média para 60 minutos de degradação foi de apenas 3,33 % e, com 90 minutos de tratamento, houve completa remoção do efeito tóxico da losartana potássica. O cromatograma para estas amostras (Figura 12b) indica a presença de subproduto de degradação com tempo de retenção de 12 minutos, contudo, os resultados ecotoxicológicos apontam que esta substância não gera efeito agudo.

**Tabela 6. Imobilidade média (%) para *D. magna* exposta a diferentes fatores de diluição de losartana potássica não tratada e após intervalos de tempo de tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Tempo de tratamento (min)	Imobilidade média (%)							σ (%)	CV (%)
	CT	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%		
0	0	0	0	0	0	13,33	76,67	2,83	1,89
30	0	0	0	0	0	6,67	100	3,69	2,08
60	0	0	0	0	0	0	3,33	0,23	4,12
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	100	3,73	2,24
240	0	93,33	100	100	100	100	100	0,31	0,03
480	0	0	0	0	0	0	56,67	2,15	2,27

Nota. CT: controle negativo. σ: desvio padrão populacional. CV: coeficiente de variação.

Fonte: Autoria própria

A partir dos valores de imobilidade média para as amostras tratadas por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seus respectivos FD, foram obtidos os valores de fator de toxicidade (FT) (Tabela 7). Antes do tratamento, o valor de FT foi igual a 4, decaindo para 2 para todos os tempos de degradação por fotólise. Já no processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chegou até a 1 (60 e 90 minutos de tratamento), exceto após 240 minutos de tratamento, onde não foi possível obter o valor de FT, sendo necessário fatores de diluição menores do que o estabelecido para que o valor de FT fosse determinado.

Tabela 7. Fator de toxicidade (FT) para *D. magna* correspondentes ao tratamento por fotólise e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seus respectivos tempos de degradação.

Tempo de tratamento (min)	FT	
	Fotólise	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	4	4
30	2	2
60	1	2
90	1	2
120	2	2
240	> 32	2
480	2	2

Fonte: Autoria própria.

Segundo os resultados divulgados pela *United State of America - Food and Drug Administration* (FDA, 2002), o valor de CE<sub>50/48h</sub> da losartana potássica para *D. magna*, é de 331 mg L<sup>-1</sup>. De acordo com Carneiro (2017), este valor foi de 303,69 mg L<sup>-1</sup>. O estudo realizado por Yamamoto et al (2012), que avaliou a ecotoxicidade aguda da losartana para *Daphnia similis*, obteve valor médio da CE<sub>50/48h</sub> de 175,26 mg L<sup>-1</sup>. Além da losartana potássica, outros fármacos dentre as sartanas também demonstraram ecotoxicidade aguda na ordem de mg L<sup>-1</sup>, para *D. magna*. Para olmesartana a CE<sub>50/48h</sub> foi >120 mg L<sup>-1</sup> e, para valsartana, > 580 mg L<sup>-1</sup> (BAYER et al., 2014).

Desta forma, a concentração de losartana potássica utilizada neste trabalho foi muito inferior àquela que poderia causar efeito agudo em *D. magna*, justificando os valores de FT ≤ 4 tanto antes quanto após os tratamentos por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, exceto pelo tratamento UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 240 minutos, os subprodutos de degradação detectados por HPLC-DAD (Figuras 12 e 13) não potencializaram o efeito agudo de losartana potássica, para *D. magna*.



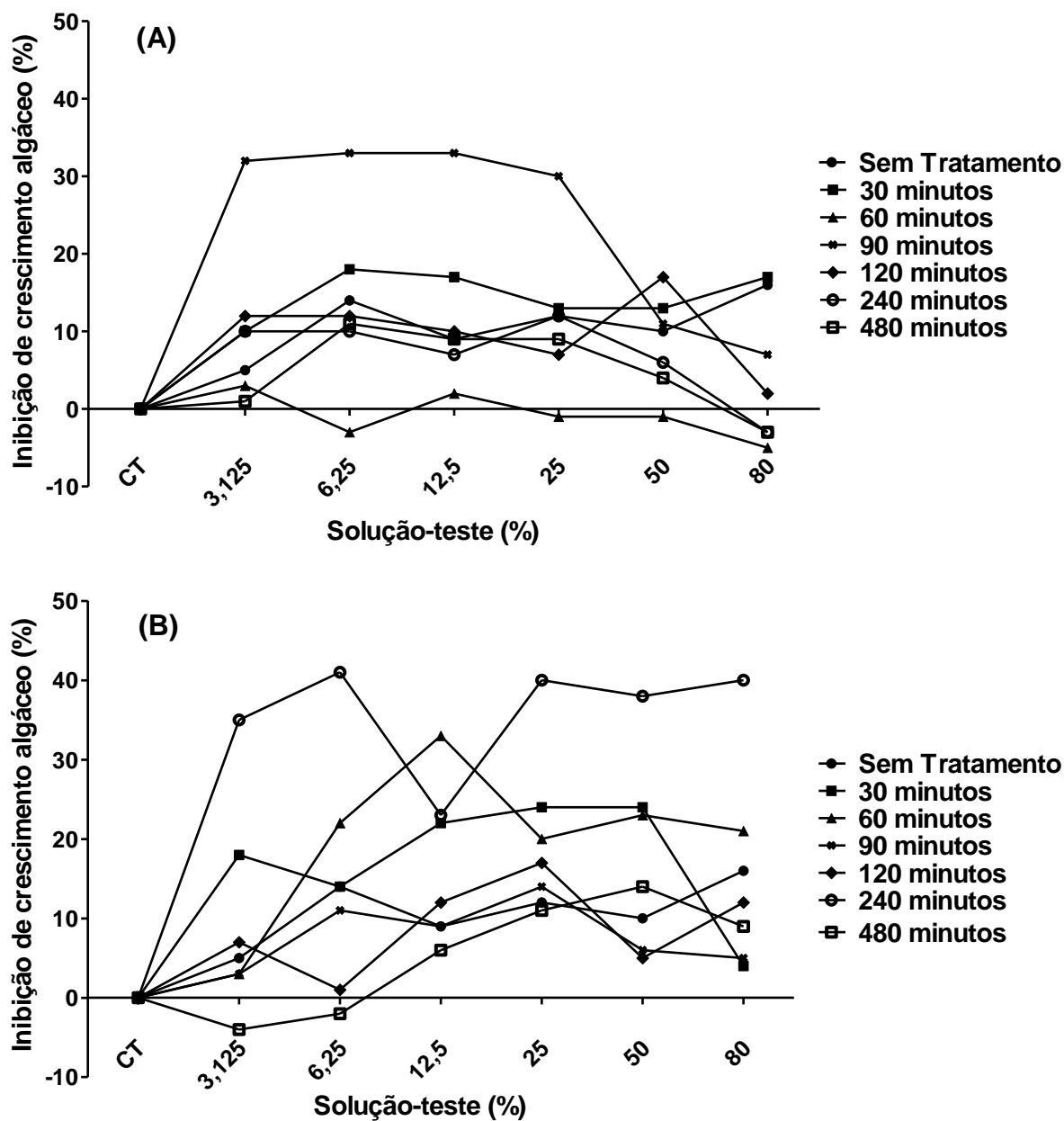
### 5.3 ECOTOXICIDADE CRÔNICA DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA *Desmodesmus subspicatus* APÓS TRATAMENTO POR FOTÓLISE E UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os valores de inibição de crescimento algáceo (ICA) em função do FD de cada solução-teste do ensaio crônico para *Desmodesmus subspicatus*, exposta à losartana potássica após tratamento por fotólise, apresentam-se na Figura 14a. O fármaco sem tratamento apresentou ICA de 16 % na maior concentração de amostra (FD = 80 %) e, após 30, 60, 90, 120, 240 e 480 minutos de tratamento por fotólise, houve a redução de ICA para 10, -5, 7, 2, -3 e -3 %, respectivamente. Deste modo, a degradação por fotólise atenuou o efeito crônico para *D. subspicatus*.

Para o tratamento de 90 minutos, observaram-se os maiores valores de ICA para os menores valores de FD (3,125; 6,25; 12,5 e 25 %), havendo significativa redução da toxicidade nas maiores proporções de volume de amostra, ou seja, FD de 50 % e 100 %. Desta forma, a inibição do crescimento algáceo não é proporcional ao aumento da concentração de amostra, indicando possível efeito hormese para a microalga, assim como visto para *D. magna* (CALABRESE, 2008).

Para o tratamento de 60 minutos (fotólise), observou-se o estímulo do crescimento da microalga, podendo ser justificado pela presença de substâncias capazes de favorecer seu crescimento celular, visto que na estrutura química da losartana potássica há elementos como potássio, nitrogênio e carbono, sendo possível a geração de subprodutos assimiláveis pelas microalgas. No ambiente, a presença de microalgas é benéfica, visto que seu metabolismo converte CO<sub>2</sub> em O<sub>2</sub>, tornando o ambiente aquático aeróbio e, assim, garantindo a dinâmica do ecossistema aquático. Contudo, a proliferação excessiva é capaz de provocar a eutrofização, impedindo a passagem de radiação solar (leva à morte de macrófitas submersas fixas e livres, dentre outras plantas aquáticas e à queda do oxigênio dissolvido), uma vez que, a crescente atividade de organismos heterotróficos aeróbios, consome o O<sub>2</sub> presente no ambiente aquático, que passa a ser anaeróbio e impróprio para organismos aeróbios, como os peixes (ESTEVES, 2011).

Figura 14. (A) Inibição do crescimento algáceo de *D. subspicatus* em função dos valores de FD de cada solução-teste, para losartana potássica sem e após tratamento por fotólise e (B) UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Fonte: Autoria própria.

Para o tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os valores de ICA em função do FD de cada solução-teste, apresentam-se na Figura 14b. Em comparação com o tratamento por fotólise, observa-se maior efeito crônico para as amostras submetidas à degradação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atingindo ICA de até 41 % para o tratamento por 240 minutos. Para os tratamentos de 30 e 60 minutos também é possível constatar efeito adverso à microalga, demonstrando aumento de ICA conforme o acréscimo de

concentração de amostra, havendo redução deste efeito crônico em FD de 80 %. Os cromatogramas do tratamento por fotólise (Figura 13a) e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 12b e 13b) observa-se a presença de subprodutos nas amostras tratadas por AOP em 30 e 60 minutos, o que é possível justificar os maiores valores de ICA.

Assim como para *D. magna*, os radicais e subprodutos gerados pela degradação incompleta, são capazes de gerar efeitos adversos à biomassa algácea, constatado para a amostra de UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 240 minutos. Contudo, a microalga é um organismo que permite obter respostas de ecotoxicidade crônica apesar das respostas do ensaio agudo indicarem a baixa toxicidade das amostras, como é o caso das amostras de 30 e 60 minutos. Desta forma, infere-se que o subproduto de degradação eluído em 12 minutos de análise, presente nas amostras tratadas por AOP em 30 e 60 minutos de degradação, pode ser responsável pela maior toxicidade crônica destas amostras.

Observou-se estímulo do crescimento da biomassa algácea em FD de 3,125 e 6,25 % para o tratamento de 480 minutos, havendo toxicidade crescente conforme aumentou o FD.

A partir dos valores de ICA, foi obtido o FT para a losartana potássica sem tratamento e após degradação por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 8). Exceto pelo tratamento de 240 minutos por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os valores de ICA para as amostras sem e após tratamento, não foram superiores a 20 % na maior concentração analisada (FD = 80 %), portanto, os valores de FT foram iguais a 1. Para a degradação UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com duração de 240 minutos, o menor valor de ICA foi de 23 %, desta forma, o FT não foi possível ser determinado.

**Tabela 8. Fator de toxicidade (FT) para *D. subspicatus* correspondentes ao tratamento por fotólise e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seus respectivos tempos de degradação.**

(continua)

Tempo de tratamento (min)	FT	
	Fotólise	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	1	1
30	1	1
60	1	1
90	1	1

Tabela 8. Fator de toxicidade (FT) para *D. subspicatus* correspondentes ao tratamento por fotólise e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seus respectivos tempos de degradação.

(conclusão)

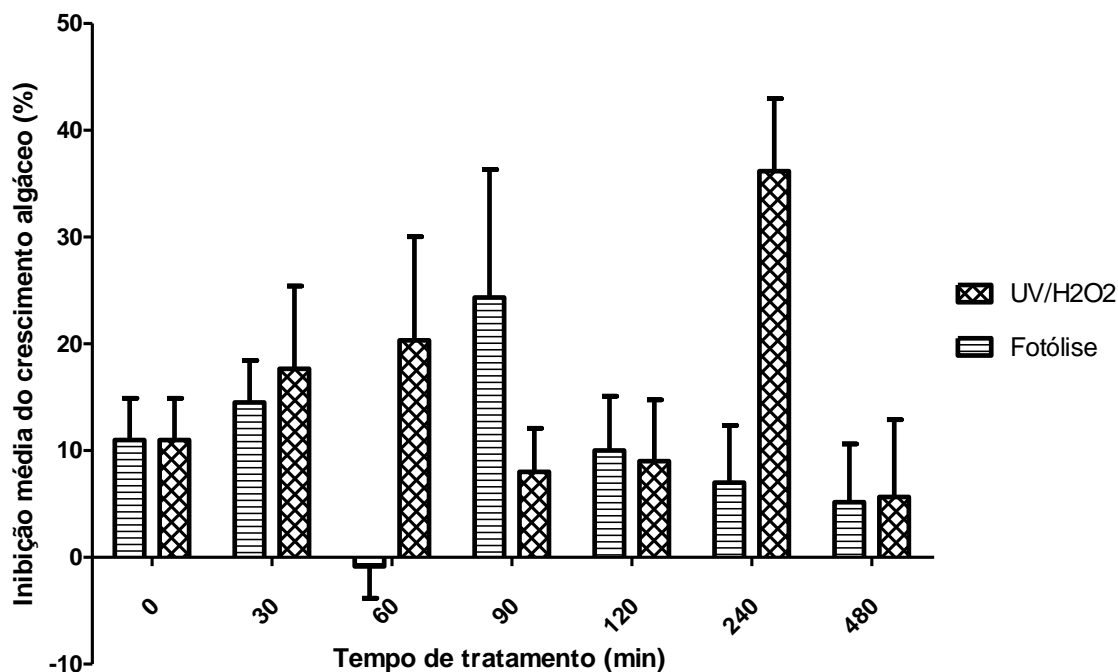
Tempo de tratamento (min)	FT	
	Fotólise	UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
120	1	1
240	1	> 32
480	1	1

Fonte: Autoria própria.

Relacionando a inibição média de crescimento algáceo para cada tratamento, fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em seus respectivos tempos de degradação (Figura 15) é possível notar a redução do efeito crônico causado pelo fármaco losartana potássica nos tempos de 60, 240 e 480 minutos devido ao tratamento por fotólise e, para UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos tempos de 90, 120 e 480 minutos. Já para os tempos de 30 e 90 minutos, pelo tratamento por fotólise, houve a intensificação do efeito crônico causado para *D. subspicatus*, o que também ocorre para a degradação por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 30, 60 e 240 minutos. É possível inferir que o tempo de 480 minutos, para ambos os tratamentos, foi o mais eficiente para reduzir o efeito crônico sofrido pela microalga de estudo.

Segundo o estudo realizado por Bouissou-Schurtz et al. (2014), utilizando a microalga *Selenastrum capricornutum* (ou também conhecida como *Raphidocelis subcapitata*), o fármaco losartana potássica não apresentou risco ecológico, visto que a razão entre a concentração ambiental considerada no estudo (0,011 µg L<sup>-1</sup>) e a concentração estimada que não causa efeito ao organismo (14,3 mg L<sup>-1</sup>) foi de  $7,6 \times 10^{-7}$ . Levando em consideração a concentração de losartana quantificada por Larsson, Pedro, Paxeus (2007), para o efluente de uma ETDI que recebe efluentes de indústrias farmacêuticas, o quociente de risco ecológico (QR) seria de 0,17, o que ainda não representaria um potencial risco ecológico, visto que o valor de QR deve ser > 1 para que seja possível inferir que a substância é capaz de apresentar risco ao ecossistema. Desta forma, elucida a baixa ecotoxicidade do fármaco para *D. subspicatus*, visto que não foi observado efeito crônico antes ou após os tratamentos por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo os valores de FT iguais a 1 para todas as amostras, exceto em 240 minutos de tratamento por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Figura 15. Inibição média do crescimento algáceo de *D. subspicatus* para losartana potássica, após tratamento por fotólise e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Fonte. Autoria própria.

Godoy, Kummrow e Pamplin (2015) avaliaram os efeitos da losartana potássica para a macrófita *Lemna minor*, sendo o quociente de risco ecológico entre  $6 \times 10^{-3}$  a  $9 \times 10^{-3}$  para águas superficiais e efluentes de ETE, chegando a 39,2 para a concentração do fármaco no efluente de ETDI descrito por Larsson, Pedro e Paxeus (2007), que é lançado em corpos hídricos receptores. Portanto, apesar do baixo risco ecológico, não se rejeita a possibilidade de injúrias ambientais causadas pela presença de losartana potássica em organismos aquáticos, como as macrófitas.

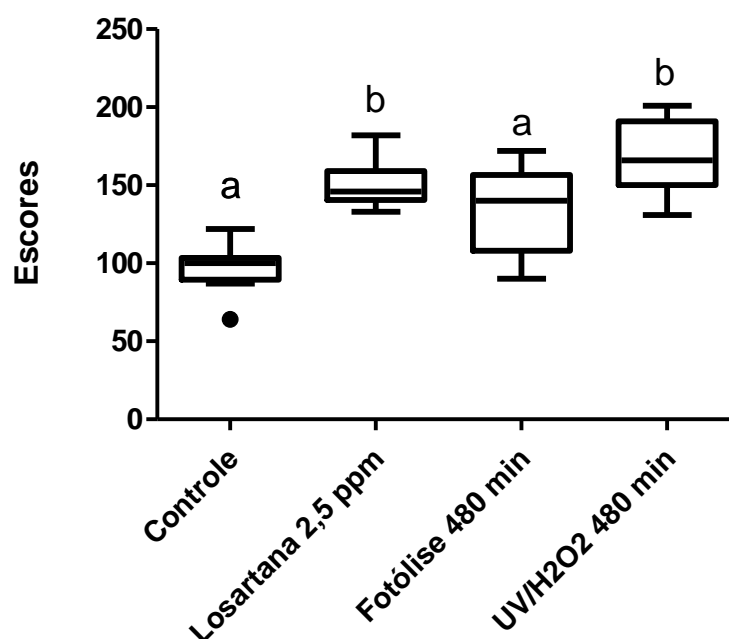
Segundo o ensaio ecotoxicológico realizado pela FDA (2002), para a microalga verde *Selenastrum capricornutum*, o valor de concentração de efeito não observado (CENO) para losartana potássica foi de  $143 \text{ mg L}^{-1}$ . Carneiro (2017) avaliou o efeito crônico de losartana potássica para *D. subspicatus*, sendo a concentração de efeito observável (CEO<sub>50/72h</sub>) de  $27,93 \text{ mg L}^{-1}$ . Bayer et al. (2014) avaliaram o efeito crônico de fármacos pertencentes ao grupo das sartanas, para *D. subspicatus*, sendo o valor de CE<sub>50/72h</sub>  $>120 \text{ mg L}^{-1}$  para olmesartana e  $>115 \text{ mg L}^{-1}$  para a valsartana. Portanto, constata-se que a concentração de estudo ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) é muito inferior à concentração que causa inibição em 50 % do crescimento da biomassa algácea, o que também pode justificar os valores de FT indicarem que não

há efeito crônico da losartana potássica, sem e após degradação, para *D. subspicatus*.

#### 5.4 GENOTOXICIDADE DE LOSARTANA POTÁSSICA PARA *Daphnia magna* APÓS TRATAMENTO POR FOTÓLISE E UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Os escores calculados para a análise de genotoxicidade da losartana potássica, em sua forma inalterada e depois de submetida a 480 minutos de tratamento por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando *Daphnia magna* como organismo-teste, apresentam-se na Figura 16. As medianas foram de 100, 146, 140 e 166 para o controle, losartana potássica 2,5 mg L<sup>-1</sup>, fotólise 480 minutos e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 480 minutos, respectivamente. Desta forma, o maior efeito genotóxico foi observado para a amostra tratada por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido da losartana potássica na conformação original e, o menos tóxico, a amostra tratada por fotólise.

Figura 16. Análise genotóxica da losartana potássica 2,5 mg L<sup>-1</sup> após tratamento por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Nota: Letras iguais indicam a não diferença estatística significativa com relação ao controle, letras diferentes indicam a diferença estatística significativa comparada ao controle.

Fonte: Autoria própria

Através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis obteve-se valor-p = 0,0002, portanto, constatou-se que há diferença estatística entre os grupos. Desta forma, prosseguiu-se com o teste de comparação múltipla de Dunn, pelo qual foi possível comparar os grupos.

Houve diferença significativa entre o grupo controle quando comparado com a losartana na sua conformação original, ou seja, sem tratamento, e também para o tratamento por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Desta forma, infere-se que ambos são substâncias genotóxicas para *D. magna*, visto que a exposição a estas amostras foi capaz de causar danos ao DNA deste organismo. Contudo, para o tratamento por fotólise, observa-se que não houve diferença significativa em comparação com o controle, sendo o tratamento de 480 minutos capaz de atenuar o efeito genotóxico do fármaco para *D. magna*.

A análise cromatográfica, após SPE, indica a presença apenas do subproduto com tempo de retenção de 12 minutos, para o tratamento por fotólise (Figura 13a), cujo intermediário não apresentou toxicidade aguda e, através das respostas de genotoxicidade, não é capaz de causar danos ao DNA da *D. magna*. Contudo, os intermediários detectados na amostra tratada por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (480 minutos) (Figura 13b), apesar de não gerarem efeitos agudos e crônicos, são capazes de fragmentar o genoma do microcrustáceo.

Carneiro (2017) avaliou a genotoxicidade da losartana potássica expondo *D. magna* em concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>, 2,5 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>, sendo as medianas dos escores iguais a 147,50, 153,50 e 186,50, respectivamente. Desta forma, em comparação com a mediana obtida neste trabalho, para a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> do fármaco, há uma diferença percentual de apenas 5 %. Além disso, é possível observar que o tratamento por fotólise de 480 minutos gerou menor efeito genotóxico do que o fármaco em concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>.

Reque (2017) realizou ensaios genotóxicos com *Astyanax altiparanae*, peixe de água conhecido como lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí, que foram expostos a losartana potássica em concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> por 6, 12, 24 e 48 h. Os resultados demonstram efeito protetivo ao DNA para este organismo-teste, visto que os escores foram menores para os indivíduos expostos ao fármaco em comparação com os grupos controle. Além disso, o tempo de exposição não influenciou nos danos causados ao DNA do lambari.

Através do ensaio cometa, para *D. magna*, foi possível constatar efeito nocivo da losartana potássica sem tratamento e após 480 minutos de degradação por UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar dos ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica indicarem a baixa toxicidade destas amostras.



## 6 CONCLUSÃO

O fármaco losartana potássica é facilmente degradado por radiação UVC, já não sendo detectado pela técnica de HPLC-DAD a partir de 30 minutos de degradação. Não demonstrou ecotoxicidade aguda e crônica para *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*, respectivamente. Contudo, em concentração de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $6 \text{ } \mu\text{M}$ ) foi capaz de gerar danos ao DNA de *D. magna*, havendo diferença significativa em comparação com o grupo controle, portanto, é uma substância genotóxica para este organismo aquático.

Os tratamentos por fotólise e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não potencializaram a ecotoxicidade aguda e crônica deste fármaco, exceto pelo tratamento de 240 minutos por processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que foi tóxico para os bioindicadores utilizados. Houve a formação de subproduto com tempo de retenção de 12 minutos, para o tratamento por fotólise (30 e 480 minutos) e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30, 60, 90, e 480 minutos). Os resultados de ecotoxicidade com *D. magna* indicaram o não efeito agudo deste intermediário. Porém, pode estar relacionado com os maiores valores de inibição de crescimento algáceo para *D. subspicatus*.

Através do ensaio cometa, constatou-se o elevado potencial genotóxico para *D. magna* para o tratamento pro processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, possivelmente pela presença de intermediários de degradação incompleta do fármaco. Já o tratamento por fotólise (480 minutos), foi capaz de reduzir os danos causados pelo fármaco losartana potássica ao DNA deste microcrustáceo, não havendo diferença significativa quando comparado com o grupo controle, apesar de ser detectado o subproduto de degradação com tempo de retenção de 12 minutos.

Considerando os resultados de ecotoxicidade aguda, crônica e genotóxica, o tratamento de 480 minutos por fotólise mostra-se o mais indicado para a remoção de losartana potássica em meio aquoso.

## REFERÊNCIAS

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DE L'ALIMENTATION, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU TRAVAIL (ANSES). **Campagne nationale d'occurrence des résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine**. Maisons-Alfort, 2011. 31 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Anuário Estatístico Do Mercado Farmacêutico 2017**. Brasília, 2018. 28 p.

ALI, A. M. M. et al. Photolysis of pharmaceuticals and personal care products in the marine environment under simulated sunlight conditions: irradiation and identification. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 17, p. 14657-14668, 2017.

ALMEIDA, R. B. et al. Uso racional de medicamentos numa proposta integrada de educação em saúde. **CEP**, v. 85, p. 1-20, 2013.

ALVES, A. C. B.; SILVANO, J.. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóccera, Crustácea) ao dicromato de potássio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 65, n. 1, p. 59-61, 2006.

ANDERSON, J. F. F. et al. Development and validation of an isocratic HPLC method for simultaneous determination of quaternary mixtures of antihypertensive drugs in pharmaceutical formulations. **Acta Chromatographica**, v. 29, n. 1, p. 95-110, 2017.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L.. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupters in sewage treatment plants: literature review. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.

ARAÚJO, K. S. et al. Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 2, 2016.

ARISTIZABAL-CIRO, C. et al. Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7335-7347, 2017.

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, 2018.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos, SP: RiMa; São Paulo, SP: InterTox, 2004.

BABARAHIMI, V. et al. Validated determination of losartan and valsartan in human plasma by stir bar sorptive extraction based on acrylate monolithic polymer, liquid chromatographic analysis and experimental design methodology. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 153, p. 204-213, 2018.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2015. 590 p.

BAYER, A. et al. Behavior of sartans (antihypertensive drugs) in wastewater treatment plants, their occurrence and risk for the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 10830-10839, 2014.

BERTOLDI, A. D. et al. Utilização de medicamentos genéricos na população brasileira: uma avaliação da PNAUM 2014. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 2, p. 11, 2016.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Pharmaceutical drugs in the environment. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOGER, B. et al. Micro-poluente emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil-Uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 725, 2015.

BONFILIO, R. et al. Losartan potassium dissolution test for drug release evaluation in pharmaceutical capsules using HPLC and UV spectrophotometry. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 377-383, 2010.

BOUISSOU-SCHURTZ, C. et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 296–303, 2014.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade analítica**. Brasília: MAPA/ACS, 2011, 227 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011**. “Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. 2011. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)>. Acesso em 23 mai. 2018

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.

CALABRESE, E. J. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 27, n. 7, p. 1451-1474, 2008.

CALOW, P. P. **Handbook of ecotoxicology**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, 2009.

CANONICA, S.; MEUNIER, L.; VON GUNTEN, U. Phototransformation of selected pharmaceuticals during UV treatment of drinking water. **Water Research**, v. 42, n. 1-2, p. 121-128, 2008.

CARDOSO, M. H. W. M. et al. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 63-72, 2010.

CARNEIRO, R. D. **Avaliação da ecotoxicidade da losartana potássica em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus***. 2017. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2017

CARPINTEIRO, I. et al. Free chlorine reactions of angiotensin II receptor antagonists: Kinetics study, transformation products elucidation and in-silico ecotoxicity assessment. **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 1000-1010, 2019.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249, 2004.

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: UNICAMP, 2006. 453 p.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA (CFF). O medicamento mais vendido no Brasil em 2014. 2015. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/noticia.php?id=2529>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

CORTEZ, F. S. et al. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 637, p. 1363-1371, 2018.

COSTA, C. R. et al. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COZAAR®: comprimidos. Responsável técnico Fernando C. Lemos. Campinas: Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2013. Bula de remédio.

DAVID, R. M. et al. Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. **Aquatic toxicology**, v. 104, n. 3-4, p. 192-204, 2011.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. **DIN 38412**: Testverfahren mit Wasserorganismen: Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Kleinkrebse (Daphnienkurzzeitest). 1982.

DOS PASSOS, V. M.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M. Validation of an isocratic HPLC assay of losartan potassium in pharmaceutical formulations and stress test for stability evaluation of drug substance. **Acta Farm Bonaerense**, v. 24, p. 250-255, 2005

ELENDT, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. **Water research**, v. 24, n. 9, p. 1157-1167, 1990.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. Morphological abnormalities in the cladoceran *Ilyocryptus spinifer* (Apipucos reservoir, Pernambuco State, Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 1, p. 53-58, 2004.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 2011. 826 p.

FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M. I.; KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes—degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere**, v. 85, n. 5, p. 693-709, 2011.

FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T. **Molecular basis of chromatographic separation**. Boca Raton, NY: CRC Press, 1997. 240 p.

GARCÍA-SEOANE, R. et al. Use of macroalgae to biomonitor pollutants in coastal waters: Optimization of the methodology. **Ecological Indicators**, v. 84, p. 710-726, 2018.

GIDDINGS, J. C. **Dynamics of chromatography: principles and theory**. Basel, NY: CRC Press, 1965. 340 p.

GOA, K. L.; WAGSTAFF, A. J. Losartan potassium. **Drugs**, v. 51, n. 5, p. 820-845, 1996

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. A. Z. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L.(1753) individually and in binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 5, p. 1112-1123, 2015.

GONÇALVES, E S. **Ocorrência e distribuição de fármacos, cafeína e bisfenol-a em alguns corpos hídricos no Estado do Rio de Janeiro**. 2016. 197 p. Tese (Doutorado em Geociências – Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.

GONZALEZ, L. et al. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 949, n. 1-2, p. 49-60, 2002.

GROS, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high- performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 1248, p. 104 -121, 2012

HERTZOG, D. L. et al. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 30, n. 3, p. 747-760, 2002.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1432 - 1442, 2011.

IKEHATA, K.; NAGHASHKAR, N. J.; GAMAL EL-DIN, M. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, n. 6, p. 353-414, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341**: Water quality - determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea): acute toxicity test. 1982.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8692**: Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. 1982.

ISMAIL, B. P. Basic principles of chromatography. In: **Food Analysis**. Springer, Cham, p. 185-211, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JUX, U. et al. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 205, n. 5, p. 393-398, 2002.

KANAKARAJU, D.; GLASS, B. D.; OELGEMÖLLER, M. Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. **Journal of environmental management**, v. 219, p. 189-207, 2018.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water research**, v. 42, n. 13, p. 3498-3518, 2008.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. **Chemosphere**, v. 77, n. 4, p. 518-525, 2009a.

KIM, I.; YAMASHITA, N.; TANAKA, H. Performance of UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2-3, p. 1134-1140, 2009b.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water research**, v. 41, n. 5, p. 1013-1021, 2007.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment international**, v. 35, n. 2, p. 402-417, 2009.

KNAPIK, L. F. O. **Ecotoxicidade do inseticida Malathion e seus efeitos sobre os biomarcadores ensaio cometa e acetilcolinesterase em *Daphnia magna***. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis (SC): FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KOT-WASIK, A.; JAKIMSKA, A.; ŚLIWKA-KASZYŃSKA, M.. Occurrence and seasonal variations of 25 pharmaceutical residues in wastewater and drinking water treatment plants. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 12, p. 661, 2016.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Átomo, 2009.

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

LEE, H.; SHIM, H. O.; LEE, H. S. Simultaneous determination of losartan and active metabolite EXP3174 in rat plasma by HPLC with column switching. **Chromatographia**, v. 42, n. 1-2, p. 39-42, 1996.

LEE, S. W.; KIM, S. M.; CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 86-91, 2009.

LEITE, G. D. Q. **Efeitos crônicos da angiotensina II sobre a atividade e expressão da isoforma 3 do trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**. 2011. 120 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LEWIS, D. The Absorption Spectrum of the Titanium (IV)–Hydrogen Peroxide Complex. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 62, n. 9, p. 1145-1146, 1958.

LOSARTANA POTÁSSICA: comprimidos. Farmacêutico responsável Marco Aurélio Limirio G. Filho. Anápolis: Neo Química, 2011. Bula de remédio.

LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. In: **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**. EDP Sciences, p. 85-101, 2003.

MAGALHÃES, D. P.; FERRAO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: chapter 3-clinical and complementary assessment. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 14-17, 2016.

MARGOT, J. et al. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? **Science of the Total Environment**, v 461 - 462, p. 480 - 498, 2013.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Emerging contaminants in aquatic matrices from Brazil: Current scenario and analytical, ecotoxicological and legislative aspects. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094-1110, 2017.

NUNES, B. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, v. 2, n. 1, 2010.

OGA, S.; CAMARGO, M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008. 677 p.

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.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD 202**: Guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD 201**: Guidelines for the testing of chemicals - Alga, Growth Inhibition Test. 1984.

PAPICH, M. G. **Manual Saunders de Terapia Veterinária**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.

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.



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

PARSONS, S. **Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment**. IWA publishing, 2004.

PELLEGRI, V.; GORBI, G.; BUSCHINI, A. Comet assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. **Aquatic toxicology**, v. 155, p. 261-268, 2014.

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

POLINKO, M. et al. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 33, n. 1, p. 73-84, 2003.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N.. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) from two areas of the Marimbus Pantanal (Baiano and Remanso). **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 549-566, 2015.

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

REQUE, R. **Avaliação da ecotoxicidade de losartana potássica em *Astyanax altiparanae* (lambari) através de ensaio cometa e biomarcadores bioquímicos**. 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, n. 15, p. 4311–4340, 2011.

RODRIGUÉZ, R. O.; DAO, T. S.; WIEGAND, C. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 215, p. 2795-2805. 2012.

RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SACHER, F. et al. Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **Journal of chromatography A**, v. 938, n. 1-2, p. 199-210, 2001.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, n. 3, p. 18-29, 2001.

SANTOS, L. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban

wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v 461-462, p. 302-316, 2013.

SATHE, S. R.; BARI, S. B. Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption densitometry. **Acta chromatographica**, n. 19, p. 270-278, 2007.

SEILER, R. L. et al. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. **Groundwater**, v. 37, n. 3, p. 405-410, 1999.

SILVA, C. G. A. et al. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVADO, C. Pharmacogenetic and antiepileptics. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 51-56, 2008.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3 ed. New York, US: Wiley-VCH, 2010.

SOUZA, D. B. S.; FELISBERTO, S. A. *Comasiella, Desmodesmus, Pectinodesmus e Scenedesmus* na comunidade perifítica em ecossistema lêntico tropical, Brasil Central. **Hoehnea**, São Paulo , v. 41, n. 1, p. 109-120, 2014.

SPERLING, M. **Lagoas de estabilização**. 2.ed. amp. e atual. Belo Horizonte: UFMG, 2002. 196 p.

STARLING, M. C. V. M et al. Degradation of Losartan Potassium and Furosemide by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. In: **CIPOA-3rd Iberoamerican conference on advanced oxidation technologies**. 2017.

STARLING, M. C. V. M et al. Intensification of UV-C treatment to remove emerging contaminants by UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV-C/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>: Susceptibility to photolysis and investigation of acute toxicity. **Chemical Engineering Journal**, 2019.

TABAK, H. H., BUNCH, R. L. Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 11, p. 367-376, 1970.

TAN, C. et al. Degradation of antipyrine by UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/PS. **Journal of hazardous materials**, v. 260, p. 1008-1016, 2013.

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

UTZIG, L. M. **Avaliação da fitotoxicidade, ecotoxicidade e genotoxicidade de clorpirifós após tratamento por radiação UVC e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VALCÁRCEL, Y. et al. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1336-1348, 2011.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, p. 231, 1969.

VETTORELLO, G. et al. Micropoluentes em água: o novo desafio emergente. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 14, n. 1, 2017.

VILLARES, R. et al. Metal levels in estuarine macrophytes: differences among species. **Estuaries**, v. 28, n. 6, p. 948-956, 2005.

WATANABE, H. et al. Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 26, n. 4, p. 669-676, 2007.

WRIGHT, D. A.; WELBOURN, P. **Environmental Toxicology**. Cambridge University Press, 2002.

YAMAMOTO, N. S. et al. Avaliação dos efeitos biológicos do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (CRUSTACEA, CLADOCERA). **Unisanta BioSci**, v. 1, p. 49-53, 2012.

YANG, Yuan-Yuan et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and artificial sweeteners (ASs) in surface and ground waters and their application as indication of wastewater contamination. **Science of The Total Environment**, v. 616, p. 816-823, 2018.

YUAN, F. et al. Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2-3, p. 1256-1263, 2011.

YUAN, F. et al. Degradation of selected pharmaceuticals in aqueous solution with UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Water Research**, v. 43, n. 6, p. 1766-1774, 2009.

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

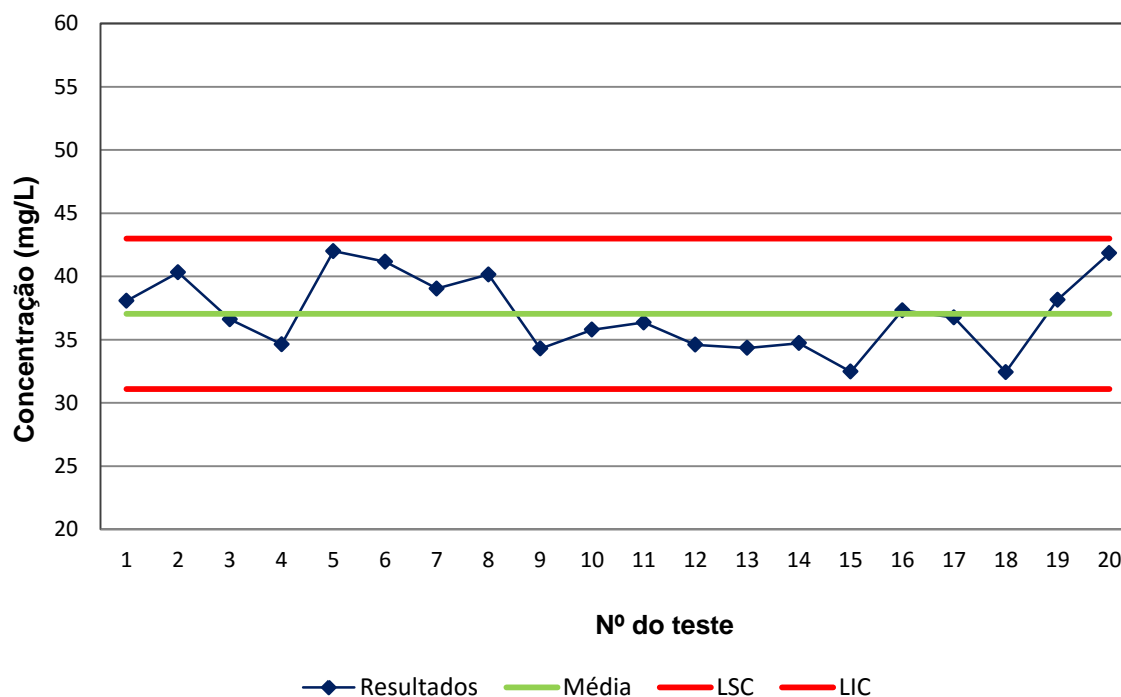
ZAPPAROLI, I. D.; CAMARA, M. R. G.; BECK, C. Medidas Mitigadoras para a Indústria de Fármacos Comarca de Londrina-PR, Brasil: Impacto Ambiental do Despejo de Resíduos em Corpos Hídricos. In: **3rd International Workshop Advances in Cleaner Production**. 2011.

ZWIENER, C. F. F. H.; FRIMMEL, F. H. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. **Water Research**, v. 34, n. 6, p. 1881-1885, 2000.

## APÊNDICE A

Carta-control de sensibilidade de *Daphnia magna* ao Sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) como substância de referência (Figura 17). Valores de  $CE_{50}$  obtidos após 24 horas de exposição, calculados através do método Probitos.

Figura 17. Carta-control de sensibilidade de *Daphnia magna* ao  $ZnSO_4$ .

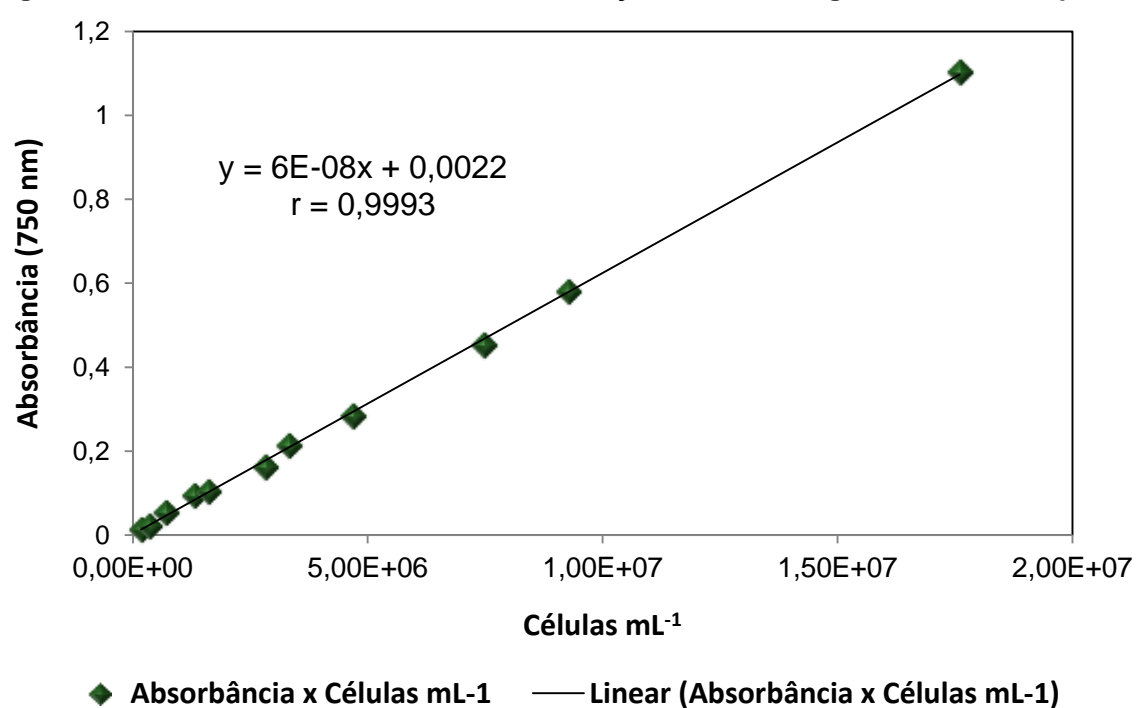


Legenda: LSC: limite superior de controle. LIC: limite inferior de controle  
Fonte: Autoria própria.

## APÊNDICE B

Curva analítica para *D. subspicatus*, relacionando absorvância luminosa em comprimento de onda de 750 nm em função da densidade de biomassa algácea (células mL<sup>-1</sup>) (Figura 18). O valor do coeficiente de correlação (r) evidencia que 99,93 % dos valores de y são elucidados pela regressão linear.

Figura 18. Curva analítica de absorvância em função de células algáceas de *D. subspicatus*.



## ANEXO A

Composição e volume das soluções adicionadas em 1 litro de meio de cultivo (M4) e água de diluição (Tabela 9).

**Tabela 9. Reagentes utilizados nas soluções-estoques e volumes adicionados para preparar 1 L de meio M4 e água de diluição.**

(continua)

Substância química	Quantidade (g) para 1 L de solução	Volume adicionado ao meio M4 / (mL)	Volume adicionado à água de diluição / (mL)
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	73,5	3,2	3,2
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	123,3	0,8	0,8
<b>KCl</b>	5,8	0,8	0,8
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	64,8	0,8	0,8
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	7,21		
<b>LiCl</b>	6,12		
<b>RbCl</b>	1,42		
<b>SrCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	3,04	0,1	-
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,335		
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,260		
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	0,200		
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	0,548		
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	5,719		
<b>NaBr</b>	0,032		
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,126	0,5	-
<b>NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub></b>	0,00115		
<b>KI</b>	0,0065		
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	0,00438		
<b>Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub></b>	21,465	0,2	-

**Tabela 9. Reagentes utilizados nas soluções-estoques e volumes adicionados para preparar 1 L de meio M4 e água de diluição.**

Substância química	Quantidade(g) para 1 L de solução	Volume adicionado ao meio M4 / (mL)	(conclusão)
			Volume adicionado para água de diluição / (mL)
<b>Na<sub>2</sub>EDTA.7H<sub>2</sub>O</b>	0,500	5,0	-
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,1991		
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,286	0,5	-
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,368		
<b>Hidrocloreto de tiamina</b>	0,750		
<b>Cianocobalamina (vitamina B12)</b>	0,010	0,1	-
<b>D (+) Biotina</b>	0,0075		

Fonte: ABNT NBR 12713:2016



## ANEXO B

A tabela 10 apresenta a composição das soluções que compõe o meio DIN e volumes adicionados para preparar 1 litro de pré-cultura assim como para o ensaio com *D. subspicatus*.

**Tabela 10. Constituição do meio DIN pré-cultura e para o bioensaio.**

Reagente	Quantidade(g) para 1 L de solução	Volume adicionado: DIN pré-cultura / (mL)	Volume adicionado: DIN ensaio / (mL)
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	1500		
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	1200		
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	1800	10	100
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	1500		
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	160		
<b>FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	80		
<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	100	1	10
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	185		
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	415		
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	7		
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	30	1	10
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	15		
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	10		

Fonte: ABNT NBR 12648:2018