

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

NATHÁLIA SAYURI YAMAMOTO

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS ANTI-
HIPERTENSIVOS LOSARTAN E VALSARTAN EM OURIÇO-DO-MAR
LYTECHINUS VARIEGATUS (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).**

SANTOS/ SP

2014

NATHÁLIA SAYURI YAMAMOTO

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS ANTI-
HIPERTENSIVOS LOSARTAN E VALSARTAN EM OURIÇO-DO-MAR
LYTECHINUS VARIEGATUS (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação da: Prof. Dra. Luciana Lopes Guimarães.

SANTOS/SP

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que a reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da base.

YAMAMOTO, N. S. Avaliação ecotoxicológica dos fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Santa Cecília, 2014.

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Yamamoto, Nathália Sayuri.

Avaliação ecotoxicológica dos fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea) / Nathália Sayuri Yamamoto.

-- 2014.

n. de f.79.

Orientador: Luciana Lopes Guimarães.

Coorientador: Camilo Dias Seabra Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Santos, SP, 2014.

1. Ecotoxicologia. 2. Fármacos anti-hipertensivos. 3. Losartan
4. Valsartan. 5. *Lytechinus variegatus*. I. Guimarães, Luciana Lopes, orient.
II. Pereira, Camilo Dias Seabra, coorient. III. Avaliação ecotoxicológica dos
fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus
variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

*Dedico este trabalho ao meu pai Fumio
Yamamoto, in memoriam.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus,

À minha mãe Yuriko Yamamoto,

À minha irmã Cláudia Midori Yamamoto,

Ao meu noivo Thiago Almeida de Jesus.

Aos meus colegas do laboratório de Ecotoxicologia,

Aos professores mestres Fernando Sanzi Cortez e Fabio Hermes Pusceddu, e também ao professor Dr. Aldo Ramos Santos, do laboratório de Ecotoxicologia da Unisanta pela ajuda, compreensão, dedicação e entendimento.

Ao professor Walber Toma, pelas aulas de farmacodinâmica.

Especialmente à minha orientadora Professora Dra. Luciana Lopes Guimarães, pela sabedoria, compreensão, pela ajuda, dedicação e pelo exemplo.

E ao meu co-orientador Professor Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, pela sabedoria, orientação, compreensão e paciência.

Agradeço a todos que me ajudaram a diretamente e indiretamente na realização deste trabalho.

RESUMO

Os fármacos anti-hipertensivos são amplamente utilizados no mundo todo. Há evidências da ocorrência de compostos como o Losartan e o Valsartan em matrizes ambientais e nos efluentes domésticos. Diante deste contexto, este estudo avaliou os efeitos biológicos agudos e crônicos dos fármacos Losartan e Valsartan por meio de ensaios de toxicidade com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Os ensaios agudos foram realizados de acordo com o protocolo da USEPA (2002). O Losartan apresentou o valor da concentração de inibição (CI_{50}) média estimada de 292,93 mg.L⁻¹, podendo ser classificado como “Não Tóxico” pela diretiva 93/67/CEE (Comunidade Econômica Europeia), que classifica substâncias de acordo com os resultados pontuais de toxicidade.

Os valores encontrados para os efeitos agudos para o fármaco Valsartan encontraram-se acima de 100mg.L⁻¹, podendo este também classificado como “Não Tóxico” pela diretiva 93/67/CEE..Os ensaios crônicos foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 15350 (2012) e revelaram os valores médios de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) de 50 mg.L⁻¹ e CEO (Concentração de Efeito Observado) de 70 mg.L⁻¹ para o Losartan e valores médios de CENO de 9,37 mg.L⁻¹ e CEO de 18,75 mg.L⁻¹ para o Valsartan, diferenças que poderiam ser justificadas pelos valores de coeficiente de partição K_{ow} destas moléculas. Os valores médios estimados de CI_{50} para o Losartan e o Valsartan, no ensaio de toxicidade crônica, foram 98,94 mg.L⁻¹ e 18,22 mg.L⁻¹ podendo ser classificados como “Nocivos”, pela diretiva 93/67/CEE. É improvável a ocorrência de efeitos adversos agudos e crônicos destes fármacos no ambiente aquático marinho, pois as concentrações de efeitos são superiores às concentrações já relatadas em ambiente aquático. No entanto, novos estudos que visam à análise dos efeitos dos metabólitos e as concentrações ambientais de ambos os fármacos assim como a investigação dos mecanismos de toxicidade são necessários para um melhor entendimento da dinâmica destes compostos em ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Fármacos anti-hipertensivos. Losartan. Valsartan. *Lytechinus variegatus*.

ABSTRACT

The antihypertensive drugs are widely used worldwide, with evidence of the occurrence of these compounds as Losartan and Valsartan in low concentrations in environmental matrices and domestic effluents. Due to these facts, this study evaluated the effects of drugs Losartan and Valsartan through toxicity tests to assess the chronic effects on sea-urchin *Lytechinus variegatus*. The acute assays were conducted according to the protocol of USEPA (2002). Losartan showed the value of inhibiting concentration (IC_{50}) estimated average of 292.93 mg L^{-1} , which can be classified as "Non Toxic" by directive 93/67/EEC (European Economic Community), which classifies substances according with specific toxicity results. The Valsartan acute toxicity assays was conducted in the highest concentration of 100 mg L^{-1} , because the drug can not be solubilized above this concentration with the solvent DMSO. However, at this concentration showed normal fertilization rate, with near to the control with water. Chronic assays were performed according to ABNT NBR 15350/2012, for pharmaceuticals Losartan and Valsartan, which showed means values NOEC (No Observed Effect Concentration) was 50 mg.L^{-1} and CEO (Concentration Effect Observed) was 70 mg.L^{-1} for Losartan and means values NOEC was $9,37 \text{ mg. L}^{-1}$ and CEO was $18,75 \text{ mg L}^{-1}$ for Valsartan, differences that could be justified by the values of K_{ow} these two molecules. Acute assays of Losartan showed means values for inhibition concentration (CI_{50}) $292,93 \text{ mg.l}^{-1}$, and it could be classified "Not Toxic" for 93/67/EEC directive, with this point toxicity. These results demonstrate the unlikely occurrence of ecological risk of these drugs in the environment, because it is, in effect concentrations higher than those already reported in the aquatic environment.

Keywords: Ecotoxicology. Antihypertensive Pharmaceuticals. Losartan. Valsartan. *Lytechinus variegatus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. POSSÍVEIS ROTAS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE.....	19
FIGURA 2. ECOTOXICOLOGIA – CIÊNCIA MULTIDISCIPLINAR.....	25
FIGURA 3. NÍVEIS DE ORGANIZAÇÃO BIOLÓGICA E RESPOSTA AOS EFEITOS DE POLUENTES.....	26
FIGURA 4. <i>LYTECHINUS VARIGATUS</i> (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).....	35
FIGURA 5. TANQUE COM <i>LYTECHINUS VARIGATUS</i>	35
FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO LOSARTAN.....	36
FIGURA 7. ESTRUTURA QUÍMICA DO VALSARTAN.....	37
FIGURA 8. ÓVULOS FERTILIZADOS DE <i>L. VARIEGATUS</i>	41
FIGURA 9. O APLICAÇÃO DE KCL EM OURIÇO-DO-MAR <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i>	43
FIGURA 10. FÊMEA LIBERANDO ÓVULOS EM UM BÉQUER E A COLETA DE ESPERMATOZOIDES DO MACHO COM UMA PIPETA DE PASTEUR.....	44
FIGURA 11. ESPERMATOZÓIDES DE <i>L. VARIEGATUS</i> NO BÉQUER ENVOLTO DE GELO.....	44
FIGURA 12. DILUIÇÕES DOS FÁRMACOS LOSARTAN E VALSARTAN.....	45
FIGURA 13. DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL DE <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> (10X E 40X).....	47
FIGURA 14. VALORES MÉDIOS DE TOXICIDADE AGUDA (TAXA DE FERTILIZAÇÃO) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LOSARTAN.....	49
FIGURA 15. VALORES MÉDIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA (DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL NORMAL) DE <i>L. VARIEGATUS</i>	

FRENTE À EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LOSARTAN.....	50
---	----

FIGURA 16. VALORES MÉDIOS DE TOXICIDADE AGUDA (TAXA DE FERTILIZAÇÃO) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VALSARTAN.....	51
--	----

FIGURA 17. VALORES MÉDIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA (DESENVOLVIMENTO EMRBIOLARVAL NORMAL) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VALSARTAN.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM OS ARA II EM ORGANISMOS AQUÁTICOS	29
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO BASEADA NA DIRETIVA 93/67/EEC DA UNIÃO EUROPEIA	32
TABELA 3. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LOSARTAN E DO VALSARTAN.....	38
TABELA 4. PARÂMETROS E CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO AGUDO (FERTILIZAÇÃO) COM <i>L. VARIEGATUS</i>	42
TABELA 5. PARÂMETROS E CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO CRÔNICO (EMBRIOLARVAL) COM <i>L. VARIEGATUS</i>	46
TABELA 6. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERTILIZAÇÃO (TOXICIDADE AGUDA) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO AO LOSARTAN (CI_{50} E INTERVALOS DE CONFIANÇA)	49
TABELA 7. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL (TOXICIDADE CRÔNICA) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO AO LOSARTAN (CI_{50} E INTERVALOS DE CONFIANÇA)	50
TABELA 8. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERTILIZAÇÃO (TOXICIDADE AGUDA) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO AO VALSARTAN (CENO E CEO).....	52
TABELA 9. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL (TOXICIDADE CRÔNICA) DE <i>L. VARIEGATUS</i> FRENTE À EXPOSIÇÃO AO VALSARTAN (CENO, CEO, CI_{50} E INTERVALOS DE CONFIANÇA).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
PCB	Bifenilas Policloradas
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
PPCPs	<i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
PhACs	<i>Pharmaceutically Active Compounds</i>
ERA	Avaliar Risco Ambiental
CHMP	Comité de Medicamentos para Uso Humano
PEC	<i>Predicted Environment Concentration</i> (Concentração Ambiental Previsto)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AWWA	<i>American Water Work Association</i>
ISO	<i>International Organization Standardization</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
U.S. EPA	<i>Environment Protection Agency</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento ambiental do Estado de São Paulo
CE₅₀	Concentração Efetiva
CL₅₀	Concentração Letal Média
CI₅₀	Concentração de Inibição
PhACs	<i>Pharmaceutically Active Compounds</i>
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ARA II	Antagonistas dos Receptores da Angiotensina II
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação iônica
Log	Logarítimo
K_{ow}	Coeficiente de Partição (octanol/ água)
DMSO	Dimetilsufóxido

OD	Oxigênio Dissolvido
CAS RN	<i>Chemical Abstract Service Registry Number</i>
HSDB	<i>Hazardous Substances Data Bank</i>
°C	Temperatura grau Celsius
atm	Atmosfera
m³	metros cúbicos
Sal.	Salinidade
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
DP	Desvio Padrão
CV	Coeficiente de Variação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	16
----------------------------	----

1.2 FÁRMACOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1 DA ANGIOTENSINA II NO MEIO AMBIENTE.....	17
---	----

1.3 REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS ARA II DE ETE E ETAP	22
---	----

1.4 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA	24
-----------------------------------	----

1.5 ENSAIOS DE ECOTOXICOLÓGICOS DOS FÁRMACOS ARA II EM ORGANISMOS AQUÁTICOS.....	26
---	----

1.7 LEGISLAÇÃO	30
----------------------	----

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL	34
--------------------------	----

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
---------------------------------	----

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORGANISMO-TESTE.....	35
--------------------------	----

3.2 SUBSTÂNCIA-TESTE	36
----------------------------	----

3.2.1 LOSARTAN.....	36
---------------------	----

3.2.2 VALSARTAN.....	37
----------------------	----

3.3 ÁGUA DE DILUIÇÃO	38
----------------------------	----

3.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES-TESTE.....	39
--	----

3.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	39
--------------------------------------	----

3.6 ENSAIO DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO AGUDO (FERTILIZAÇÃO) COM <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)	40
---	----

3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO CRÔNICO (EMBRIOLARVAL) COM <i>LYTECHINUS VARIEGATUS</i> (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)	43
---	----

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4. RESULTADOS	48
4.1 LOSARTAN	48
4.1.1 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM LOSARTAN	48
4.1.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA COM LOSARTAN	50
4.2 VALSARTAN.....	51
4.2.1 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	51
4.2.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA

O padrão de qualidade de vida de uma população está diretamente relacionado à disponibilidade e qualidade da água, portanto a preservação deste recurso é essencial para a manutenção da vida.

A água está presente em todos os seres vivos. Cerca de 97,5 % da água no planeta correspondem a água salgada, 2,5 % à água doce, destes 68,9 % está indisponível ao homem em forma de geleiras e calotas polares, 29,9 % constituem as reservas subterrâneas e somente 1 % da água doce é aproveitável pela humanidade (REBOUÇAS, 2004). A disponibilidade dela em escala global é abundante, porém, em termos regionais é escassa e não se encontra uniformemente, espacialmente e temporalmente distribuída, devido às características naturais de cada região (FARIA et al., 2010).

Atualmente, mais de 1,3 bilhão de pessoas carecem de água doce no mundo, e o consumo humano deste recurso duplica a cada 25 anos, aproximadamente (MACHADO, 2003). De acordo com Gesamp (2001) o homem vem se estabelecendo cada vez mais em direção ao litoral, cerca de três pessoas no planeta vive hoje a cada 100 quilômetros do mar e 44 % da população mundial – mais do que habitavam o mundo inteiro em 1950 – estão a cada 150 km dele. Dois terços de todas as cidades com mais de 2,5 milhões de habitantes estão situadas na área costeira. Em 2003, a UNESCO estimou que se a população próxima aos rios continuar a crescer tanto quanto a população mundial, cerca de 18.000 km³/ano dos rios estarão degradados, se aproximadamente 2 bilhões de toneladas de lixo forem lançados todos os dias no mundo (REBOUÇAS, 2004).

No final do século XIX, a poluição aquática se tornou um problema cada vez mais evidente devido ao crescimento dos centros urbanos, no entanto, foi a partir do século XX que o uso insustentável da água foi acirrado com a aceleração do crescimento populacional. Associado a isso, o uso da água em diversas atividades humanas como, no abastecimento público e industrial, na

agricultura, na recreação, no transporte, na aquicultura, vem se tornando cada vez mais intenso (STRAYER & DUDGEON, 2010).

A qualidade da água pode ser afetada pelas mais diversas atividades antrópicas, sendo que cada uma delas geram poluentes característicos, o que leva a degradação ambiental e a diminuição significativa dos recursos hídricos. De modo genérico, a poluição das águas decorre da adição de substâncias ou de formas de energia que, diretamente ou indiretamente, alteram as características físicas e químicas do corpo d'água de maneira que prejudique a utilização das águas para usos benéficos (PEREIRA, 2004).

Segundo Moraes & Jordão (2002) entre os principais problemas que afetam a qualidade da água são os esgotos domésticos tratados de forma inadequada, assim como os controles inadequados de efluentes industriais, a perda e a destruição das bacias de captação, a localização errônea de unidades industriais e as práticas agrícolas deficientes. Além disso, a quantidade de substâncias e a diversidade de componentes químicos aumenta o risco de degradação desses ambientes (ZAGATTO, 2006). Dessa forma, muitos países atingem rapidamente condições de escassez de água ou se defrontam com os limites para o desenvolvimento econômico (MORAES & JORDÃO, 2002). Portanto, a água adquire um valor para o homem e se torna um bem econômico que deve ser preservado.

1.2 FÁRMACOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES AT1 DA ANGIOTENSINA II NO MEIO AMBIENTE

No passado recente, os estudos sobre os poluentes ambientais estavam focados principalmente na identificação dos efeitos graves, diretos e individuais dos poluentes nos ecossistemas, conhecidos como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP). Inseridos nessa classe de compostos químicos estão as dioxinas, os furanos, as Bifenilas Policloradas (PCB), o pesticida Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) e entre outros. Entretanto, o avanço da química analítica permitiu a identificação de uma classe de poluentes orgânicos denominados de Micropoluentes ou Compostos Químicos Emergentes (TERNES, 1998). Os fármacos e os produtos de higiene e cuidados pessoais

(PPCPs – *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) estão inseridos nessa nova classe de poluentes ambientais.

Os PPCPs abrangem uma grande quantidade de compostos para uso interno e externo, na medicina humana como na medicina veterinária (KHETAN & COLLINS, 2007). A grande demanda por esses produtos, assim como a quantidade de consumo, determinam a entrada rápida dessas substâncias no meio ambiente (NARVAEZ & JIMENEZ, 2012). Estes compostos incluem antibióticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antidepressivos, antipiréticos, antidiabéticos, agentes quimioterápicos e fármacos contraceptivos.

Os fármacos anti-hipertensivos são amplamente utilizados no mundo todo no tratamento da hipertensão arterial, que é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (OATES, 1996).

Os anti-hipertensivos da classe dos antagonistas dos receptores AT1 da angiotensina II (ARA II) são relativamente recentes no mercado farmacêutico, tendo início no final da década de 1980. Atualmente, os representantes desta classe que são comercializados no país são: o Losartan Potássico (Cozaar[®]), Valsartan (Diovan[®]), Candesartan Cilexetil (Blossart[®]), Irbesartan (Aprovel[®]), Olmesartan (Benicar[®]) e Telmisartan (Micardis[®]), apenas o Eprosartan e o Azilartan não são comercializados no Brasil (RAMOS & CASALI, 2012).

Os fármacos são compostos ativos produzidos para serem persistentes e manterem suas propriedades químicas o bastante, para um propósito terapêutico. Após o consumo, parte destas substâncias ainda está sujeita a metabolização, especialmente hepática, sendo então encontrado na urina e nas fezes, o fármaco íntegro e os seus metabólitos. Esses resíduos de fármacos não são totalmente removidos por processos convencionais nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) (BILA & DEZOTTI, 2003). A contaminação dos ambientes aquáticos por resíduos de fármacos pode advir de esgotos domésticos, efluentes domésticos e hospitalares. Segundo Narvaez & Jimenez (2012) também pode ocorrer contaminações por outras fontes, como por descarte inadequado de medicamentos e despejo de resíduos gerados pelas instituições de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. A figura 1 apresenta as possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente.

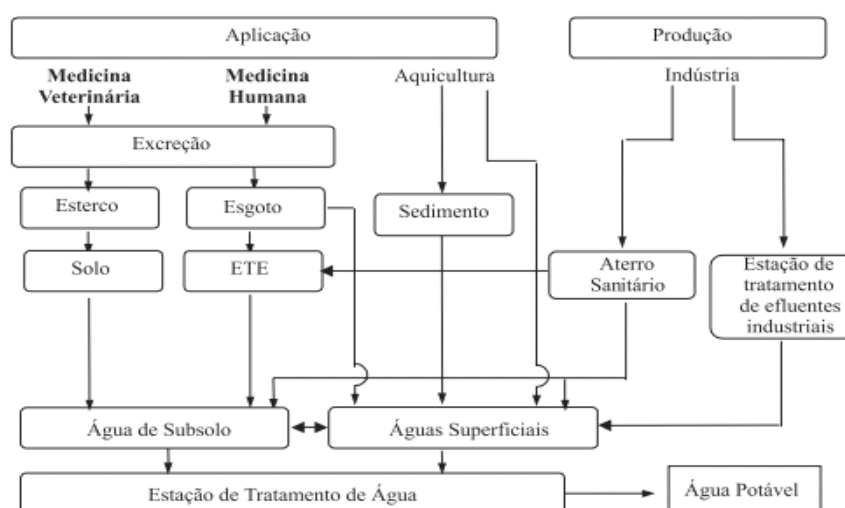


Figura 1 – Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.

Fonte: BILA & DEZOTTI (2003).

Os estudos atuais têm abordado a presença de resíduos de ARA II encontrados em matrizes ambientais, como em águas superficiais e de abastecimento, e em efluentes de ETE.

Klosterhaus *et al.* (2013) coletaram amostras de água, sedimentos e de mexilhões bentônicos (*Geukensia demissa*), em cinco pontos próximos da costa, na Baía de São Francisco, Estados Unidos. Foram identificados 108 compostos farmacêuticos, e 32 (30%) deles estavam presentes em pelo menos uma das amostras de águas superficiais e 12 foram detectados em todos os pontos coletados. O Valsartan foi o composto que apresentou a mais alta concentração de 92 ng.L^{-1} , em relação aos demais compostos detectados nas amostras de água coletadas. Nas análises de sedimentos, o Valsartan não foi quantificado. Nos mexilhões bentônicos, o composto não foi detectado, sugerindo um baixo potencial de bioacumulação ou baixa capacidade metabólica do Valsartan para esses organismos.

Em um estudo realizado por Kasprzyk-Hordern *et al.* (2009), eles identificaram diversos fármacos, disruptores endócrinos e drogas ilícitas, entre eles o Valsartan. Estes autores coletaram amostras de águas em dois pontos nos rios (Taff e Ely) e nos afluentes e efluentes de dois ETE (Cilfynydd e Coslech), no Reino Unido. Os dois rios se contrastam por um deles (Taff) ser considerado um dos maiores rios do país e o outro (Ely) ser pequeno e fluir em

uma área rural. As duas ETE escolhidas pelos autores, que passam por esses dois rios também apresentaram características diferentes. Em todas as amostras analisadas, o Valsartan esteve presente, no entanto, a amostra coletada do rio Ely, à 3,5 km após o efluente da ETE Coslech, apresentou uma concentração máxima de 144 ng.L^{-1} e média de 55 ng.L^{-1} . Entre as amostras de ETE, o afluente de ETE Coslech apresentou a maior concentração de 5388 ng.L^{-1} e média de 1734 ng.L^{-1} .

Santos *et al.* (2013) detectaram a presença do Losartan, Valsartan e Irbesartan em amostras de afluentes e efluentes de ETE, e também de efluentes de quatro hospitais, localizados em Coimbra, Portugal. Os quatro hospitais apresentavam diferentes dimensões; o primeiro deles era um hospital universitário, o segundo era um hospital geral, o terceiro era um hospital pediátrico e por último, uma maternidade. Entre os ARA II, o Valsartan foi o composto que apresentou a maior concentração em todas as amostras brutas de efluentes de hospitais, sendo a maior delas no hospital universitário, com máxima de 19822 ng.L^{-1} . Em seguida, o Irbesartan foi o composto que apresentou a maior concentração com 3860 ng.L^{-1} na maternidade. E o Losartan, apresentou a maior concentração bruta no hospital universitário com 910 ng.L^{-1} . Nas amostras de afluentes de ETE, o Valsartan apresentou a concentração média de 5117 ng.L^{-1} , o Irbesartan de 591 ng.L^{-1} e o Losartan de 237 ng.L^{-1} . Nos efluentes de ETE, a concentração média do Valsartan foi de 2377 ng.L^{-1} , o Irbesartan de 410 ng.L^{-1} e o Losartan de 143 ng.L^{-1} .

Larsson *et al.* (2007) contataram a presença do Losartan em efluentes de ETE, na Índia. Este ETE recebe efluentes das indústrias de medicamentos genéricos do local. A concentração do Losartan foi de até $2500 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Fick *et al.* (2010) coletaram amostras de efluentes de três ETE (Stockholm, Gothenburg e Umeå) da Suécia que foram escolhidas, devido ao tamanho, as tecnologias de tratamentos e localizações geográficas, serem variáveis. O tratamento de efluentes incluem a remoção química de fósforo, clarificação, tratamento de lodo ativado com remoção de nitrogênio (exceto Umeå), e segunda clarificação. Os produtos finais de todos os ETE são os lodos digeridos por processos anaeróbios. Ao mesmo tempo, os autores

obtiveram juvenis de peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss* de ambos os sexos, todos com o peso aproximado de 100 g. Fick et al. expuseram os jovens de peixes nas amostras de efluentes tratados, não diluído, com aeração em tanques com um sistema de fluxo contínuo. Na ETE de Gothenburg, esse sistema ficou exposto entre o período de 24 de fevereiro à 7 de março, na ETE de Stockholm, a duração do experimento foi de 3 de março à 16 de março, e na ETE de Umeå foi de 30 de março à 13 de maio de 2008, com temperatura variando de 9,5 a 13,5 e pH estável de 7,5 a 8,0. Durante a exposição dos peixes nas amostras, eles foram alimentados. Ao final do experimento, foram coletados aproximadamente 0,1 a 1 mL de sangue de cada peixe. Dessas amostras de sangue foram feitas análises para detectar a presença de fármacos e verificar se a concentração apresentada no sangue dos peixes é próxima da concentração conhecida capaz de causar uma resposta farmacológica em humanos. Esse modelo reflete a probabilidade de um efeito farmacológico e não se esse efeito poderia ser adverso ou não. Dos 21 fármacos identificadas nas três ETE, o Telmisartan foi detectado em concentrações de 191 ng.L⁻¹ no ETE Stockholm e 104 ng.L⁻¹ na ETE Gothenburg. Nas amostras de sangue de peixes, o Telmisartan não foi detectado no plasma.

Nödler et al. (2013) coletaram amostras de águas superficiais de diferentes pontos (rios, canal e lago), amostras de águas subterrâneas, amostras de água bruta de ETAP de Muelheim-Styrum, amostras de água de torneira de Berlim, amostras de esgoto bruto da cidade de Bitz e amostras de afluentes e efluentes de ETE de Göttingen, na Alemanha. Eles compararam (quantitativamente) a ocorrência e a persistência do ácido Valsartan, um produto de transformação (PT) do Valsartan, com outros três β -bloqueadores, com o ácido Atenolol (PT), com a Carbamazepina e com o Acesulfame (adoçante sintético). Os autores detectaram a presença do ácido Valsartan em amostras de águas superficiais, em concentrações de 2129 ng.L⁻¹, enquanto que a concentração do ácido Atenolol foi de 197 ng.L⁻¹. Nas amostras de águas subterrâneas, o ácido Valsartan não foi detectado. Nas amostras de água de torneira, a concentração máxima do ácido Valsartan foi de 72 ng.L⁻¹. Nos esgotos brutos, eles detectaram uma concentração baixa do ácido Valsartan, já

nas amostras de efluentes de ETE de Göttingen, as concentrações foram superiores a 1000 ng.L⁻¹.

Gracia-Lor *et al.* (2012) coletaram no total de 73 amostras, sendo onze amostras de águas superficiais e onze amostras de efluentes de ETE, na região da Valência (Espanha), e cinquenta e uma amostras de dois reservatórios de água na Colômbia. Nas amostras de águas superficiais o Valsartan apresentou a concentração de até 6260 ng.L⁻¹ e o Irbesartan de 651 ng.L⁻¹. Nas amostras de efluentes de ETE, o Valsartan apresentou a concentração máxima de 5899 ng.L⁻¹ e o Irbesartan de 1309 ng.L⁻¹. Nas amostras de água de ambos os reservatórios, na Colômbia, não houve evidências da presença destes fármacos.

Huerta-Fontela *et al.* (2011) coletaram amostras de água bruta na entrada da estação de tratamento de água potável (ETAP), que provém do rio Llobregat, Espanha. Eles relataram a concentração média de 260 ng.L⁻¹ para o Losartan, 685 ng.L⁻¹ para o Valsartan e 330 ng.L⁻¹ para o Irbesartan.

No Brasil, o estudo feito por Guimarães *et al.* (2012) identificaram alguns fármacos presentes em água superficial marinha, entre eles o Losartan e o Valsartan, na área adjacente ao descarte do efluente do emissário submarino de Santos, São Paulo. No estudo, foram coletadas 2 litros de água do mar, em profundidades de 1 e 8 metros, em seis pontos entorno do emissário submarino, com uma garrafa de Van Dorn, que depois foram acondicionadas em garrafas âmbar e mantidas sob baixa temperatura até o momento do processamento no laboratório. Através de análises feita, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS) foi possível quantificar os fármacos. O Losartan foi detectado em dois dos seis pontos, porém, em concentrações abaixo do limite de quantificação. O Valsartan foi identificado em três dos seis pontos e quantificado em até 24 ng.L⁻¹.

1.3 REMOÇÃO DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS ARA II DE ETE E ETAP

A presença de resíduos de fármacos no ambiente aquático, foram detectados em muitos países em concentrações na faixa de µg.L⁻¹ e ng.L⁻¹, demonstrando que muitos compostos não são completamente removidos nas

ETE e, portanto, eles estão presentes em águas superficiais, subterrâneas e em efluentes de esgoto. Por conseguinte, nos últimos anos, muitos estudos sobre a remoção desses micropoluentes foram realizados. Em relação aos ARA II, Hey *et al.* (2014) realizaram um estudo sobre a remoção do Irbesartan e do Eprosartan de quatro efluentes de ETE, na Suécia. As amostras desses quatro efluentes foram ajustadas para estarem exatamente ao pH 6,0 ou 8,0, que são normalmente os valores de pH dos efluentes da Suécia. Os efluentes 1 e 2 foram ajustados para o pH 8,0 e foram tratados com ozônio, enquanto que, os efluentes 3 e 4 foram ajustados para o pH 6,0 e foram tratados com ozônio em conjunto de peróxido de hidrogênio. A menor dose de 1,5 mg.L⁻¹ de ozônio foi utilizada na remoção dos fármacos. No efluente 1, essa dose apresentou uma redução significativa, onde 9 dos 40 compostos obtiveram uma taxa de remoção de 90 a 100%, entre eles o Eprosartan. O Irbesartan apresentou uma redução de mais de 70%, e a medida que a dose de ozônio foi aumentada para 5,5 mg.L⁻¹, o Irbesartan e outros fármacos que eram menos reativos, foram eliminados. Por outro lado, a baixa taxa de remoção dos fármacos no efluente 2, poderia ser atribuído a maior quantidade de absorção Ultra Violeta específico (SUVA) do efluente 2 em comparação ao efluente 1. No efluente 3, a taxa de remoção de fármacos foi >90%, para a metade dos compostos presentes, incluindo o Eprosartan, em dose mínima de 1,8 mg.L⁻¹. O Irbesartan foi completamente removido em doses superiores a 8 mg.L⁻¹ de ozônio. No efluente 4, os fármacos foram removidos em taxas superiores a 90% quando foram adicionadas doses de ozônio acima de 5 mg.L⁻¹.

Kasprzyk-Hordern *et al.* (2009) analisaram as tecnologia de tratamento utilizadas em duas ETE (Cilfynydd e Coslech) no Reino Unido. A ETE Cilfynydd utilizou filtros biológicos e a ETE Coslech utilizou o lodo ativado. A remoção do Valsartan foi observada com maior eficiência com o uso do lodo ativado, chegando próximos de 80%.

Huerta-Fontela *et al.* (2011) coletaram amostras em cada etapa de processamento da água da ETAP na Espanha. A água passou por diversos tratamentos como pré-oxidação com cloro, coagulação, floculação, sedimentação, filtração com areia, diluição com água subterrânea, ozonação, carvão ativado granulado, pós-cloração e distribuição. No processo de pré-

oxidação com cloro, o Losartan foi removido em 92%, o Irbesartan em 70% e o Valsartan até 20%. O Losartan foi completamente eliminado pelo processo de filtração de areia, o Irbesartan e o Valsartan foram removidos através do processo de carvão ativado granulado.

Nödler et al. (2013) detectaram a presença do ácido Valsartan em amostras de água de torneira em Berlim. Eles observaram que na ETAP de Berlim, é utilizado apenas um filtro na margem do rio, aeração e filtração (filtro rápido de areia). Isso demonstra a necessidade de aplicar tecnologias que eliminem esses resíduos. Comparando a ETAP de Berlim com os processos utilizados na ETAP de Muelheim, onde os processos de remoção seguem as etapas como filtro lento de areia/passagem de solo, ozonação, filtração biológica de multicamadas, processo de filtração biológica com carbono ativado e desinfecção Ultra-Violeta, este último apresentou resultados significativos para os fármacos, onde o ácido Valsartan foi removido pelo processo de filtração biológica de multicamadas.

Devido ao seu curto período desde a sua entrada no mercado farmacêutico, os dados sobre a ocorrência e destino dos ARA II no ambiente, ainda são limitados (NÖDLER et al. 2013). No entanto, a presença destas substâncias no ambiente aquático leva a necessidade de se conhecer os possíveis efeitos adversos sobre a biota.

1.4. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

A Ecotoxicologia é uma ciência nova em relação a tradicional toxicologia clássica, da qual evoluiu. Em 1969, o termo “Ecotoxicologia” foi sugerido pela primeira vez pelo toxicologista francês, Dr. René Truhaut, durante a reunião do *Committee of the International Council of Science*, em Estocolmo (JOLLEY; O'BRIEN & MORRISON, 2003).

A Ecotoxicologia estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (CAIRNS & NIEDERLEHNER, 1995).

A Ecotoxicologia Aquática é um dos campos de estudo da Ecotoxicologia, e abrange outras áreas da ciência, caracterizando a sua multidisciplinaridade. A figura 2 apresenta a ecotoxicologia aquática, um dos campos da Ecotoxicologia, como uma ciência que abrange outras ciências, caracterizando assim a sua multidisciplinaridade.

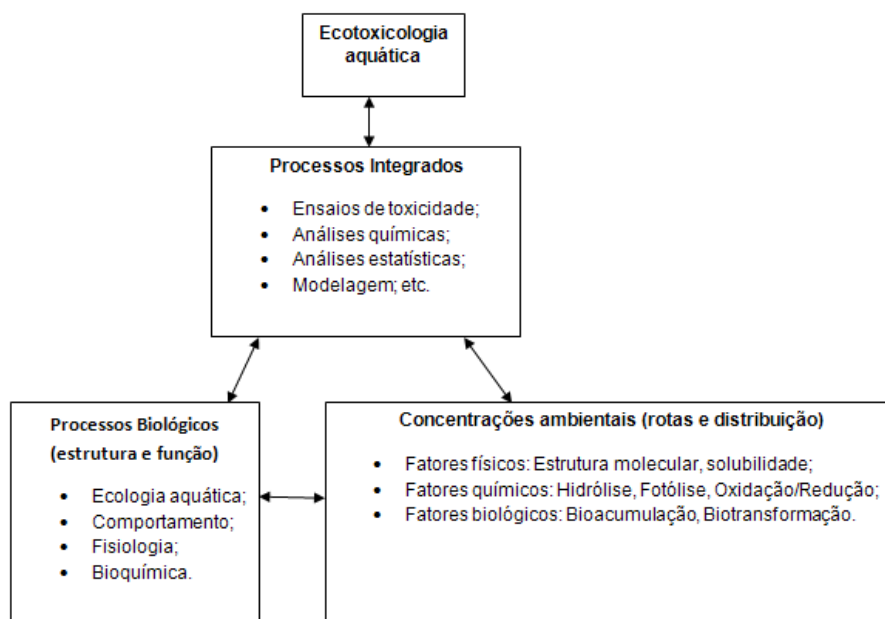


Figura 2 – Ecotoxicologia – Ciência multidisciplinar.

Fonte: RAND *et al.* (1995).

Segundo Abessa (2002) os estudos ecotoxicológicos podem ser empregados com diversas finalidades, como: o conhecimento da qualidade de águas, sedimentos, solos e do ar; a regulação e a definição de limites máximos permissíveis para o lançamento de efluentes e substâncias químicas; as estimativas do efeito de descargas de contaminantes sobre as populações naturais; a significação biológica para dados de contaminação; a definição de áreas críticas; as análises de risco ecológico; a detecção dos primeiros sinais de impactos devido a compostos “*early warning*”; fornecer significado biológico para dados de contaminação; e servir de prova legal. Além disso, do ponto de vista ecológico, os métodos mais relevantes para a avaliação da toxicidade dos contaminantes são aquelas que determinam alterações na estrutura e funcionamento dos ecossistemas (KELLY & HARWELL, 1989). Portanto, antes que os efeitos possam se expressar no nível de populações, comunidades e ecossistemas, a resposta em organismos individuais fornece uma boa

avaliação do risco de extinção local de alguns grupos de organismos susceptíveis (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). A figura 3 apresenta a escala hierárquica de respostas a estressores, onde o nível de organismo encontra-se integrado aos níveis bioquímicos, celular e fisiológico.

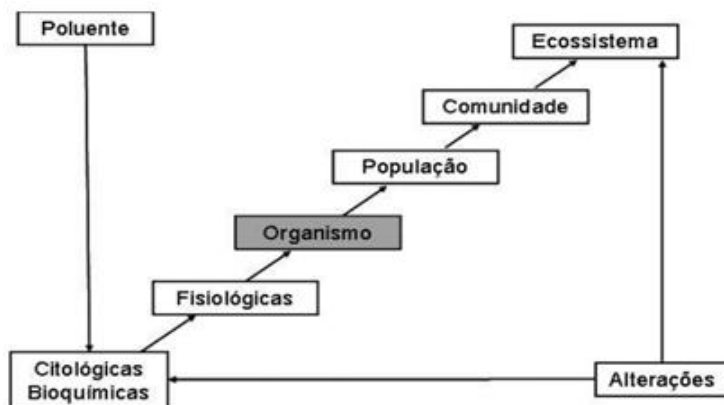


Figura 3 – Níveis de organização biológica e resposta aos efeitos de poluentes.

Fonte: MAGALHÃES & FERRÃO FILHO (2008).

1.5. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS FÁRMACOS ARA II EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

O emprego de ensaios ecotoxicológicos é de suma importância para avaliar os efeitos biológicos causados por efluente industriais e domésticos, por amostras ambientais e substâncias químicas, dentre eles os fármacos (Yamamoto et al., 2012). Eles fornecem dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de estressores ambientais (COONEY, 1995). Além disso, segundo Costa et al. (2008) a utilização de padrões de ensaios é vantajosa, pois permite a seleção de um ou mais ensaios uniformes e úteis para uma variedade de laboratórios, facilitando a comparação de dados e a reprodução dos mesmos. Embora, os detalhes específicos dos ensaios de toxicidade com os organismos possam se diferenciar entre si, o princípio básico para todos é semelhante. Os organismos-testes (peixes, microcrustáceos, algas, e outros), são expostos a várias concentrações da amostra a ser testada em recipientes (frasco-teste) por um determinado tempo. Em todos os ensaios são utilizados frasco-controle com água de diluição. Assim, após o período de exposição, são analisados os efeitos da amostra sobre os parâmetros

biológicos, como mortalidade, crescimento, reprodução e comportamento dos organismos (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

Segundo César, Silva & Santos (1997) os efeitos agudos podem causar efeitos deletérios aos organismos vivos, quando expostos a uma elevada concentração da substância tóxica, durante um curto período de exposição, onde é comum avaliar a concentração letal média (CL₅₀) ou a concentração efetiva média (CE₅₀) que observa a mortalidade ou a imobilidade (respectivamente) em 50% dos organismos-teste.

Já no efeito crônico, o agente tóxico pode causar um efeitos sub-letais, aos organismos-teste em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). O ensaio de toxicidade para avaliação dos efeitos crônicos permite a sobrevivência dos organismos-teste, no entanto, afetam uma ou várias funções biológicas, como a reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e no comportamento em geral (CÉSAR; SILVA & SANTOS, 1997).

Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Work Association* (AWWA), *International Organization Standartization* (ISO), órgãos de proteção ambiental como: *Environmental Canada* e *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos (U.S. EPA). No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também tem padronizado os ensaios de toxicidade (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006; COSTA et al., 2008).

No estudo feito por Weltiman et al. (2012) realizaram ensaios ecotoxicológicos com o fármaco Azilsartan em organismos aquáticos. No ensaio de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, a metodologia utilizada pelos autores foi a diretriz 201 da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômica) (2011), e as concentrações estabelecidas para o ensaio foram 1; 10 e 100 mg.L⁻¹, por um período de 72 horas.

No ensaio de toxicidade para avaliação do efeito crônico com a *Daphnia magna*, com a diretriz 211 da OECD (2012), foram utilizadas as neonatas com idades < 24 horas e foram colocadas uma em cada réplica (vinte réplicas), na concentração de 10 mg.L⁻¹, mantidas em um ciclo de 8 horas de escuridão e 16 horas de luz, por um período de 21 dias. O número de *D. magna* adultas com imobilidade foram contadas diariamente. Os autores observaram a produção de efípios durante o ensaio.

O ensaio de toxicidade com os embriões de peixe *Pimephales promelas* seguiu a diretriz 210 da OECD (2013). Vinte ovos fertilizados com idades > 24 horas foram expostos em cada réplica (seis réplicas) na concentração de 10 mg.L⁻¹, durante 30 dias. O ensaio foi conduzido em condições semi-estáticas com trocas a cada um dia no início do experimento, e depois com trocas a cada três dias no estágio embriolarval, e com três renovações semanais até o final do ensaio. Na tabela 1 estão apresentados os dados ecotoxicológicos dos ARA II em organismos aquáticos.

Tabela 1 – Ensaios ecotoxicológicos com os ARA II em organismos aquáticos.

Fármacos Anti-hipertensivo	Espécie	End Point	Referência
Losartan	<i>Microcystis aeruginosa</i>	CENO _{10 dias} = 556 mg.L ⁻¹	FDA – CDER (2002)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CENO _{10 dias} = 143 mg.L ⁻¹	
	<i>Daphnia magna</i>	CL _{50 48h} = 331 mg.L ⁻¹	
	<i>Pimephales promelas</i>	CL _{50 48h} = >1000 mg.L ⁻¹	YAMAMOTO et al. (2012)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL _{50 96h} = >929 mg.L ⁻¹ CENO _{96h} = 929 mg.L ⁻¹	
	<i>Daphnia similis</i>	CE _{50 48h} = 175,26 mg.L ⁻¹	
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO _{7 dias} = 10 mg.L ⁻¹ CEO _{7 dias} = 100 mg.L ⁻¹	
Valsartan	Alga	CE _{50 72h} = 90 mg.L ⁻¹ CENO = 58 mg.L ⁻¹	FDA – CDER (2009)
	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50 48h} = 580 mg.L ⁻¹ CENO = 280 mg.L ⁻¹	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL _{50 96h} = >100 mg.L ⁻¹ CENO _{96h} = 100 mg.L ⁻¹	
Candesartan cilexetil	Alga	CE _{50 72h} = > 0,012 mg.L ⁻¹	SDS-ASTRAZENECA (2013)
	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50 48h} = > 0,016 mg.L ⁻¹ CENO _{21dias} = 100 mg.L ⁻¹	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL _{50 96h} = > 0,017 mg.L ⁻¹	SDS-ASTRAZENECA (2011)
Irbesartan	<i>Daphnia magna</i>	CL _{50 48h} = 191 mg.L ⁻¹	SDS-USP (2011)
Telmisartan	<i>Daphnia sp.</i>	CE _{50 48h} = 18 mg.L ⁻¹	MSDS-MICARDIS (2011)
Azilsartan	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CENO _{72h} = > 77 mg.L ⁻¹	WELTMAN et al. (2012)
	<i>Daphnia magna</i>	CENO _{21dias} = > 10 mg.L ⁻¹	
	<i>Pimephales promelas</i>	CENO _{30 dias} = > 8,8 mg.L ⁻¹	

Yamamoto et al. (2012) realizaram ensaios de toxicidade aguda e crônica do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*. Foram realizados três ensaios agudos com o Losartan em *D. similis* de acordo com a norma ABNT NBR 12713/2009. As neonatas de 6 a

24 horas foram expostas a diferentes concentrações do Losartan, em quatro réplicas, por um período de 48 horas na câmara de germinação com 16 horas de luz difusa, e em temperatura controlada de 20 ± 2 °C. Após o período de exposição (48 horas), foram analisadas a imobilidade e mortalidade dos organismos nas diferentes concentrações. Foi utilizado o método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* para determinar a concentração efetiva inicial mediana ($CE(I)_{50}$). No ensaio preliminar crônico com a *Ceriodaphnia dubia*, foi realizada conforme a norma ABNT NBR 13373/2010, as neonatas de até 24 horas foram expostas a diferentes concentrações do Losartan por um período de sete dias, com fotoperíodo de 16 horas de luz difusa e temperatura de 25 ± 2 °C controlados. O ensaio foi realizado em condições semi-estáticas, onde a água do controle e as soluções-teste eram renovadas a cada dois dias e as neonatas geradas foram retiradas e contadas. Ao final do ensaio, os dados foram analisados com o software *TOXTAT 3.5* para determinar a concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO).

O candesartan cilexetil é uma pró-droga de uso oral, que é rapidamente hidrolisada e se torna ativa (Candesartan) durante a sua absorção no trato gastrointestinal (BLOPRESS[®], 2013). Os dados ecotoxicológicos do Candesartan cilexetil apresentou-se mais significativo em comparação com o Losartan e o Valsartan.

Como foram apresentados na tabela anteriormente, os ensaios ecotoxicológicos com os ARA II foram realizados com organismos de água doce (alga, microcrustáceos e peixes). Dados sobre os ensaios com os organismos marinhos não foram encontrados na literatura.

1.6 LEGISLAÇÃO

A contaminação ambiental por resíduos farmacêuticos apresentam lacunas na legislação ambiental, ou seja, não possuem limites de concentrações bem definidos. Tais substâncias merecem maior atenção, e dependendo de estudos sobre a sua ocorrência e dos seus efeitos potenciais sobre a biota, podem ser candidatos a futuras regulamentações (OLLER et al., 2011).

Nos Estados Unidos, os produtos farmacêuticos são regulamentados pela FDA (*Food and Drug Administration*), onde os novos produtos (alimentos e medicamentos, tanto para humanos como para animais), que irão entrar no mercado passam por um processo de revisão ambiental e são minuciosamente estudados antes que a sua comercialização seja aprovada.

Apenas nos últimos anos, uma avaliação ambiental tem sido exigida como um pré-requisito para o registro de novos medicamentos. Nos Estados Unidos e na Europa, estão em vigor os procedimentos para Avaliar o Risco Ambiental (ERA). Na Europa o Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) da EMEA (Agência Europeia de Medicamentos) têm publicado diretrizes para o ERA, que entrou em vigor em 01 de dezembro de 2006.

Na Europa, a diretriz da EMEA (EMEA/CHMP/SWP/4447/00) (2006) estabelece como avaliar os riscos potenciais do fármaco no ambiente. Ela descreve passo a passo os procedimentos que devem ser estabelecidos, focando apenas nos riscos ambientais associados ao uso dos medicamentos, e não decorrente do armazenamento, eliminação, síntese ou fabricação do medicamento. Na primeira fase da avaliação (Fase I) é realizada uma pré-triagem com objetivo de obter uma estimativa da exposição, onde o limite de ação se encontra até $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, se o valor do PEC (*Predicted Environment Concentration*) ou (Concentração Ambiental Previsto) da superfície da água for abaixo desse limite, é assumido que o composto representa pouco risco ao meio ambiente. No entanto, se o valor do PEC for igual ou superior a esse limite, é necessário fazer uma avaliação do destino e do efeito ambiental do composto na Fase II. A Fase II se divide em (Fase II em Nível A) onde uma pré-avaliação é feita com base em dados ecotoxicológicos e no risco, e, (Fase II em Nível B) onde essa avaliação é estendida e tem como objetivo um estudo da substância e do compartimento específico com base em um conjunto de dados estendidos em emissão, destinos e efeitos do composto (GRUNG *et al.*, 2008).

Em 2006, foi aprovada uma nova legislação, pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho da Comunidade Europeia, um sistema integrado sobre o registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas: REACH.

No âmbito dessa política, estando em vigor desde então, as substâncias químicas são classificadas de acordo com os resultados pontuais de toxicidade (valores de CE_{50} , CI_{50}) pela diretiva 93/67/CEE (CEE - Conselho da Comunidade Europeia) (CEC, 1996). Na tabela 2 apresenta a classificação das substâncias químicas em quatro classes diferentes (Extremamente tóxico, muito tóxico, tóxico, nocivo e não tóxico), com base na diretiva 93/67/CEE.

Tabela 2 – Classificação baseada na diretiva 93/67/CEE da União Europeia.

Não tóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
$CE_{50} > 100$ $mg.L^{-1}$	CE_{50} entre 10 e 100 $mg.L^{-1}$	CE_{50} entre 1,0 e 10 $mg.L^{-1}$	CE_{50} entre 0,1 e 1,0 $mg.L^{-1}$	$CE_{50} < 0,1$ $mg.L^{-1}$

No âmbito nacional, a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, onde estão incluídas as concentrações máximas para algumas substâncias orgânicas e inorgânicas em águas para abastecimento humano, no entanto, esta portaria não contempla os resíduos de fármacos (BRASIL, 2004).

Agora em vigência, a Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que dispõe sobre os parâmetros, condições, padrões e diretrizes para a gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores, complementa e altera a Resolução nº 357/05, do qual dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes. De acordo com a Resolução nº 430/11, o artigo 2º estabelece a disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não está sujeita aos parâmetros e padrões de lançamento dispostos nesta Resolução, não podendo, todavia, causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas. O artigo 3º afirma que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos

receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis. O artigo 8º do Capítulo I das definições determina que seja vedado, nos efluentes, o lançamento dos POP. O artigo 18º do Capítulo II sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, determina que o efluente não deva causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. No inciso 1º deste artigo, estabelece, que os critérios de ecotoxicidade previsto no *caput* do artigo, devem se basear nos resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes. No inciso 2º determina ao órgão ambiental competente a especificação das vazões de referência do efluente e do corpo receptor a serem consideradas no cálculo da CECR (Concentração do Efluente no Corpo Receptor), além dos organismos e dos métodos de ensino a serem utilizados, bem como a frequência de eventual monitoramento. No inciso 3º determina, que na ausência de critérios de ecotoxicologia estabelecidos pelo órgão ambiental para avaliar o efeito tóxico do efluente no corpo receptor. Porém, não estabelecem limites máximos para os resíduos de fármacos em águas subterrâneas, residuais e para o consumo humano (BRASIL, 2013)

Em vista destes fatos, tornam-se essenciais estudos que visem à avaliação dos efeitos tóxicos de fármacos sobre o ecossistema aquático. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos biológicos agudos e crônicos dos fármacos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, organismo-modelo para o ecossistema aquático marinho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar avaliação ecotoxicológica dos fármacos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos biológicos adversos dos fármacos Losartan e Valsartan por meio de ensaios de toxicidade para avaliação dos efeitos agudos (Fertilização) em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.
- Avaliar os efeitos biológicos adversos dos fármacos Losartan e Valsartan por meio de ensaios de toxicidade para avaliação dos efeitos crônicos (Embriolarval) em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORGANISMO - TESTE

Alguns animais marinhos têm sido utilizados como organismos-teste em ensaios de toxicidade e no presente estudo utilizou-se o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, organismo-teste citado na norma ABNT NBR 15350 (2012), que dispõe sobre testes de toxicidade de curta duração. Esta espécie é encontrada desde a Carolina do Norte (Estados Unidos) até a costa sudeste do Brasil, apresentada na figura 7. Eles pertencem a família *Toxopneustidae*. Possuem carapaça esverdeada e achatada inferiormente, seus espinhos podem ter a cor variando do verde até a púrpura.

Os ouriços-do-mar são considerados bons bioindicadores ambientais por terem alta sensibilidade às mudanças que ocorrem no ambiente, além disso, estes invertebrados marinhos são animais com forma de vida sedentária, o que permite investigar a contaminação de um determinado local ao longo do tempo (VENTURA et al., 2007). Os estágios de invertebrados marinhos são menos tolerantes aos agentes tóxicos do que o estágio adulto, e por isso tem sido utilizado para avaliar a qualidade da água marinha e dos sedimentos (BELLAS et al., 2005).

Os exemplares de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, apresentados na figura 4 são empregados nos ensaios para avaliação de efeito agudo e crônico foram coletados por meio de mergulho livre na Ilha das Palmas, localizada no município de Guarujá, SP.

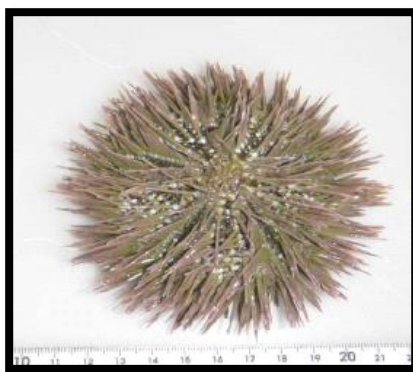


Figura 4 – *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea).

Fonte: CORTEZ (2011)

Depois, os organismos foram armazenados em caixas térmicas, recobertos com algas do gênero *Ulva sp.*, e transportados até o laboratório, onde foram mantidos em um tanque com água do mar coletada na Ilha das Palmas, sob forte aeração, e em condições ideais para estes organismos, até o momento da realização dos ensaios. A figura 5 apresenta os ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* no tanque com água do mar sob forte aeração.



Figura 5 – Tanque com *Lytechinus variegatus*.

A manutenção destes organismos no tanque, assim como, a verificação dos seus parâmetros físico-químicos são observados diariamente, como a temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD), obedecendo as condições ideais para esses organismos, conforme a norma ABNT NBR 15350/2012.

3.2 SUBSTÂNCIA - TESTE

3.2.1 LOSARTAN

O Losartan (2-butil-4cloro-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'bifenil]-4-il]metil]1H-imidazol-5-metanol) é comercializado sob a forma de sal de potássio (Losartan Potássico), número de registro CAS 124750-99-8, sendo então a forma de sal de potássio do Losartan adotada no presente estudo (figura 6). O Losartan Potássico apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, sendo solúvel em água e etanol, praticamente insolúvel em acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metileno (BRASIL, 2010).

A molécula de Losartan apresenta um centro ácido (anel tetrazólico) e um centro básico (anel imidazólico) e, portanto apresenta dois valores de pka distintos e que foram determinados experimentalmente: $pka=4,25$ para o anel tetrazólico e $pka=2,95$ para o anel imidazólico. Em $pH > 7$ prevalecem as formas aniônicas do Losartan (A^-) (Tosco et al., 2008).

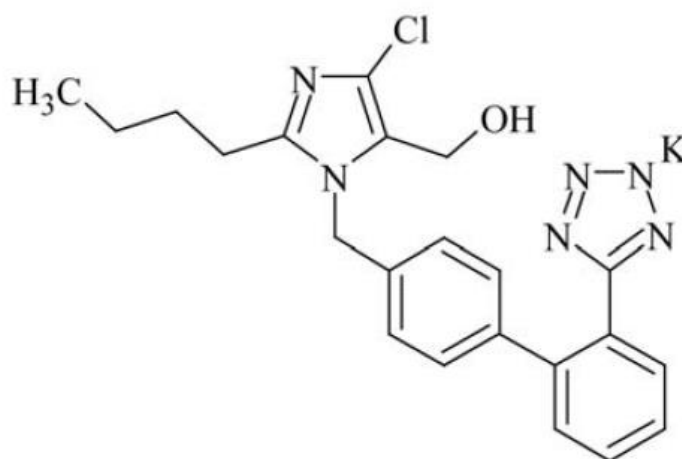


Figura 6 – Estrutura química do Losartan potássico.

Fonte: Brasil (2010).

3.2.2 VALSARTAN

O Valsartan (*N*-(1-Oxopentil)-*N*-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-yl]metil]-L-valine), de registro número CAS 137862-53-4, é levemente solúvel em água, solúvel em metanol e etanol e apresenta-se sob a forma de pó branco (HSDB, 2014). A molécula do Valsartan apresenta dois sítios ácidos, o grupamento COOH e o anel tetrazólico tendo então dois valores de pka (constante de dissociação) distintos e que foram determinados experimentalmente: $pka= 3,60$ para o grupamento COOH e $pka= 4,7$ para o anel tetrazólico (Tosco et al., 2008). Em $pH > 6,7$ o Valsartan existe quase que exclusivamente na forma de diânion (A^{2-}). A figura 7 apresenta a estrutura química do Valsartan.

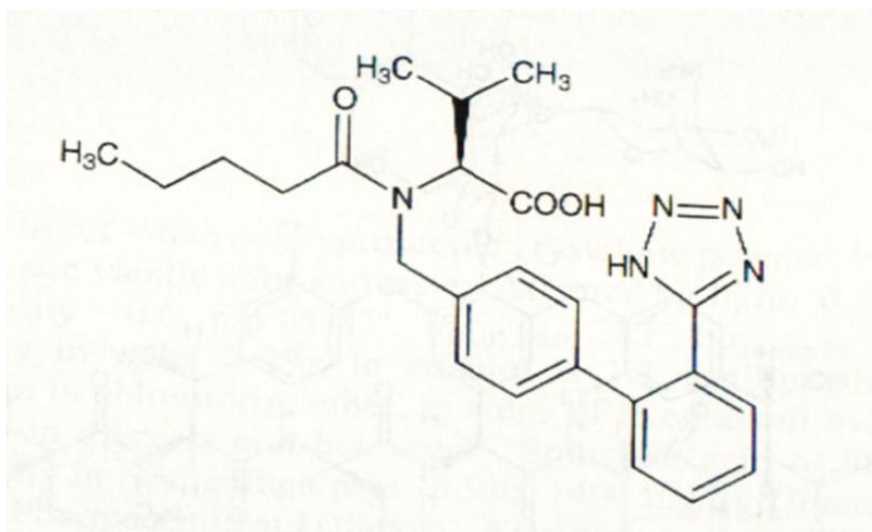


Figura 7 – Estrutura química do Valsartan.

Fonte: The Merck Index (2001).

A tabela 3 apresenta as principais características físico-químicas e outras informações ambientalmente relevantes do Losartan Potássico e do Valsartan a partir de dados obtidos do Hazardous Substances Data Bank (HSDB, 2013) banco de dados vinculado ao U.S. National Library of Medicine e ao U.S. National Institutes of Health (NIH). Outros dados foram obtidos a partir da Interface EPI SUITE[®] v.4.11 (ANEXOS A e B), que consiste num pacote de programas de estimativas de propriedades físico-químicas e destinos ambientais desenvolvido pelo EPA's Office of Pollution Prevention Toxics e o Syracuse Research Corporation (USEPA^{1,2}, 2012). Os programas utilizados a partir da interface EPI SUITE estarão assinalados em cada parâmetro analisado e a notação SMILES das moléculas necessária para os cálculos foi obtida através do banco de dados SPIDERCHEM (Royal Society of Chemistry^{1,2}, 2014).

TABELA 3 . Características físico-químicas outras informações ambientalmente relevantes do Losartan Potássico e do Valsartan

	Losartan Potássico	Valsartan
Número de registro CAS	124750-99-8	137862-53-4
Fórmula Molecular	C ₂₂ -H ₂₂ -Cl-K-N ₆ -O	C ₂₄ -H ₂₉ -N ₅ -O ₃
Peso Molecular	461,01 g/mol	435,5 g/mol
Ponto de Fusão	183,5 – 184,5 °C	116 – 117 °C
Pressão de Vapor (mm Hg a 25°C)*	1,64 x 10 ⁻²⁶	8,18 x 10 ⁻⁶
Constante de Henry (coef. de partição ar/água) (atm.m³/mol a 25°C)**	2,94 x 10 ⁻²⁷	1,82 x 10 ⁻¹⁸
Solubilidade em Água a 25°C***	3,382 mg.L ⁻¹	1,406 mg.L ⁻¹
Coeficiente de Partição octanol/água (Log Kow)[†]	3,01	3,65
Coeficiente de Adsorção em solo (Koc) (L.Kg⁻¹)^{††}	5,69x10 ⁵	2,26x10 ⁴
Estimativa de Biodegradação Rápida^{†††}	NÃO	NÃO
Produtos do metabolismo humano (metabólitos)	5-carboxylic acid metabolite (EXP-3174)	4-hydroxy valsartan

* EPI SUITE/MPBPVP v1.43; ** EPI SUITE/HENRYWIN v3.20; ***EPI SUITE/WSKOW v1.42; [†]EPI SUITE/KOWWIN v1.68; ^{††} EPI SUITE/KOCWIN v2.0 (método Molecular Connectivity Index); ^{†††} EPI/SUITE BIOWIN v4.1;

Fonte: HSDB (2013); USEPA (2012)

3.3 ÁGUA DE DILUIÇÃO

Para os ensaios de toxicidade com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, foi utilizada a água reconstituída, preparada a partir de sal marinho comercial da marca CORAL PRO SALT (RED SEA®) diluída em água processada, homogeneizada com ajuda de um agitador magnético por um período de uma hora. Após este processo, foi ajustado a salinidade, o pH (potencial hidrogeniônico) e o OD (oxigênio dissolvido), para as condições ideais dos organismos-teste. Conforme a norma ABNT NBR 15350 (2012) a água reconstituída foi mantida sob aeração de no mínimo 24 horas, antes dos ensaios.

3.4 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES-TESTE

Segundo César, Silva e Santos (1997) um ensaio de ecotoxicidade é realizado em duas etapas: um preliminar e o definitivo. O ensaio preliminar é realizado nas mesmas condições que o ensaio definitivo, no entanto, é realizada com concentrações estabelecidas com limites de grande amplitude, para determinar o intervalo de concentrações, delimitando a concentração mais elevada na qual não é observado efeito e pela menor concentração que causa a imobilidade ou mortalidade a 100% dos organismos. O ensaio definitivo é realizado com intervalo de concentrações estabelecidas no ensaio preliminar, com concentrações intermediárias em progressões geométricas onde são expostos os organismos-teste.

Para os ensaios preliminares para avaliação dos efeitos agudos e crônicos com os fármacos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, as concentrações estabelecidas foram de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 mg.L⁻¹.

Foram realizados primeiramente os ensaios crônicos do Losartan e do Valsartan e posteriormente os ensaios agudos destes dois fármacos.

3.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

As variáveis físico-químicas foram analisadas antes e depois de cada ensaio, sendo todas tabeladas.

3.6 ENSAIO DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO AGUDO (FERTILIZAÇÃO) COM *LYTECHINUS VARIEGATUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).

O método utilizado no presente estudo seguiu o protocolo da USEPA (2002), e foi adaptado para a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. É importante estabelecer neste método uma proporção de espermatozoides/óvulo que propicie uma taxa de fertilização adequada de 70% a 90% no controle deste ensaio. Para a liberação dos gametas, a metodologia utilizada foi a norma técnica ABNT/NBR 15350 (2012) conforme descrita no item 3.7.

Após a obtenção dos gametas femininos e masculinos, as etapas seguintes do ensaio, foram executadas conforme o protocolo da USEPA (2002). Para obter uma concentração aproximada de 5×10^7 de espermatozoides/ mL foi necessário coletar 0,5 mL de espermatozoides de três machos ($n=3$) com uma pipeta de Pasteur de ponta fina, colocar em um béquer de 30 mL e adicionar 24,5 mL de água de diluição no momento dos experimentos, para ativar a solução espermática. Segundo Mastroti (2002) adicionando 10 μ L dessa solução em cada frasco-teste (tubos de ensaio), é possível obter a concentração adequada de espermatozoides para a realização do ensaio. Baseando-se nisso, foi adicionada uma quantidade superior (150 μ L) da solução espermática em cada frasco-teste. Após esse procedimento, o conjunto foi mantido em câmara incubadora com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 20 minutos.

Os óvulos de três fêmeas ($n=3$) foram coletados em um béquer de 600 mL e posteriormente filtrados em uma malha de 350 μm , depois de esperar que os óvulos estivessem decantados no fundo do recipiente, foi retirado o sobrenadante e adicionado a água de diluição até completar 600 mL. Este procedimento foi repetido três vezes para a retirada de impurezas e espinhos.

Em seguida, foram retiradas três alíquotas de 10 μL desta solução e colocadas na câmara de Sedgwick-Rafter para a contagem de óvulos (de tamanhos homogêneos, lisos e redondos) no microscópio Meiji®. A partir da média das três alíquotas de óvulos, foi feita um cálculo para obter a concentração aproximada de 2000 óvulos/ mL necessário para o experimento. Em seguida, essa concentração (2000 óvulos) foi adicionada em cada frasco-teste e mantida em câmara incubadora com temperatura constante de 25 ± 2 °C. Aguardados vinte minutos, o ensaio foi encerrado adicionando 0,5 mL de formol tamponado com bórax em todas as réplicas.

A leitura do ensaio foi feito com o microscópio Meiji® e com a câmara de Sedgwick-Rafter, onde foram contados os primeiros 100 ovos. O número de óvulos fertilizados (identificados com pela presença da membrana de fecundação) e não fertilizados foram anotados em uma planilha. Na figura 8, a seta vermelha indica a membrana de fecundação.

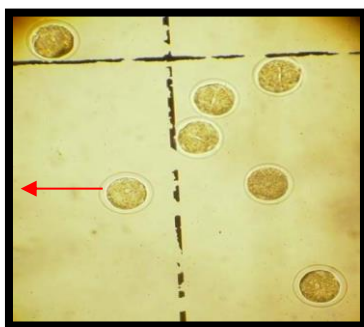


Figura 8. Óvulos fertilizados de *L. variegatus*.

Fonte: Modificado de CORTEZ (2011).

As concentrações estabelecidas para o ensaio definitivo com Losartan foram de 100; 200; 400; 800 e 1600 mg.L^{-1} e um controle com água reconstituída com sais marinhos. Essas concentrações foram estabelecidas a partir de um ensaio preliminar nas concentrações de 50; 70; 98; 137,2; 192,08 mg.L^{-1} e um controle com água reconstituída com sais, onde verificou-se a formação da membrana de fecundação, acima de 70% em todas as réplicas dos ensaios, inclusive na maior concentração (192,08 mg.L^{-1}), demonstrando que não ocorreu efeitos significativos em relação ao controle com água

reconstituída com sais marinhos. Portanto, utilizando um fator de diluição de 1,3 foram estabelecidas essas concentrações definitivas.

Para as diluições do fármaco Valsartan, foi necessário a utilização do solvente dimetilsufóxido (DMSO) (2 mL) para a solubilização inicial deste fármaco na maior concentração (100 mg.L⁻¹). As concentrações estabelecidas para o ensaio definitivo com Valsartan foram de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg.L⁻¹ e um controle com água reconstituída com sais marinhos e um controle com DMSO em número de quatro réplicas por ensaio (n=3).

TABELA 4 . Parâmetros e condições para avaliação de efeito agudo (fertilização) com *L. variegatus*.

Parâmetros	Condições
Temperatura	25 ± 2 °C
Água de diluição	Água do mar natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1 hora e 20 minutos
Recipiente-teste	Tubos de ensaios com capacidade de 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	Aproximadamente 5 x 10 ⁷ espermatozoides e 2000 óvulos por frasco-teste.
Idade do organismo-teste	Gametas recém liberados de ouriço-do-mar
Efeito observado	Taxa de fertilização
Validade do ensaio	De 70% a 90% de fertilização no controle
Alimentação	Sem

Fonte: United States Environmental Protection Agency. USEPA (2002).

3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DE EFEITO CRÔNICO (EMBRIOLARVAL) COM *LYTECHINUS VARIEGATUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA).

O ensaio crônico foi conduzido de acordo com a norma da ABNT/NBR 15350/2012 e consiste na exposição de embriões do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, por um período de 24 a 28 horas, a várias concentrações da substância que será analisada durante o período de desenvolvimento embriolarval.

Inicialmente, para obtenção dos gametas de *Lytechinus variegatus*, foi aplicada uma injeção de KCl 0,5 M na região aboral do ouriço-do-mar, como demonstrado na figura 9.



Figura 9. Aplicação de KCl 0,5 M em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

Após a indução dos gametas, as fêmeas (n=3) foram identificadas (coloração alaranjada) e acondicionadas em recipientes menor que o seu diâmetro, com a superfície aboral voltada para baixo, onde os ovócitos foram mantidos até o momento da fertilização. A figura 10 demonstra a obtenção de óvulos da fêmea de *L. variegatus*. Após esperar que os óvulos estivessem decantados no fundo do recipiente, foi descartado o sobrenadante e as soluções foram filtradas em uma malha de 350 μ m para um mesmo béquer, com o objetivo de reter os espinhos e fezes que poderiam ser liberados juntos com os gametas. Depois, adicionou à solução de óvulos, a água de diluição, elevando o volume para 600 mL.

Os machos (n=3) foram estimulados e os espermatozoides (coloração branca) foram coletados com uma pipeta de Pasteur de ponta fina, como é

demonstrada na figura 10, e depois foram armazenados em béqueres secos de 30 mL, envolto com gelo (figura 11), não havendo contato dos espermatozoides com a água de diluição até o momento de início dos experimentos.



Figura 10 – Fêmea liberando óvulos em um béquer e a coleta de espermatozoides do macho com uma pipeta de Pasteur.



Figura 11 – Espermatozoides de *L. variegatus* no béquer envolto de gelo.

Em seguida, no momento da fecundação, foi preparada uma solução de 0,5 mL de espermatozoides e avolumada com água de diluição. A solução foi agitada de modo suave para evitar a formação de grumos. Após esse procedimento, adicionou-se de 1,2 mL a 2 mL da solução de espermatozoides no recipiente com os ovócitos, e durante 10 minutos foi levemente agitada para a fertilização.

Posteriormente, foram retiradas três alíquotas de 10 μ L dessa solução e observada em câmara de Sedgwick-Rafter para verificar a taxa de fertilização dos ovócitos, a qual, pelos critérios de aceitabilidade do ensaio, deve ser de no mínimo de 80%. A contagem de ovos das três alíquotas possibilitou a obtenção da média de ovos e o cálculo do volume da solução a ser adicionado nas concentrações-teste, que deve ser de 300 ovos.

Foram realizados três ensaios crônicos com o Losartan e três ensaios com o Valsartan, cada ensaio foi conduzido com quatro réplicas a partir das concentrações determinadas de ensaios preliminares. Para o Losartan as concentrações para o ensaio definitivo foram 50; 70; 98; 137,2; 192,08 mg.L⁻¹ e um controle com água reconstituída com sais marinhos, estabelecidas a partir de um ensaio preliminar concentrações com o Losartan nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 mg.L⁻¹ e um controle com água.

Para as diluições do Valsartan, foi necessário primeiramente, solubilizar com o solvente DMSO (dimetilsulfóxido) e depois em água de diluição. As concentrações para o Valsartan foram 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg.L⁻¹ e um controle com água reconstituída com sais marinhos e um controle com DMSO. Para a determinação das concentrações do Losartan e do Valsartan foi utilizado um fator de diluição de 2. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaios contendo 10 mL de solução-teste, como demonstra a figura 12.

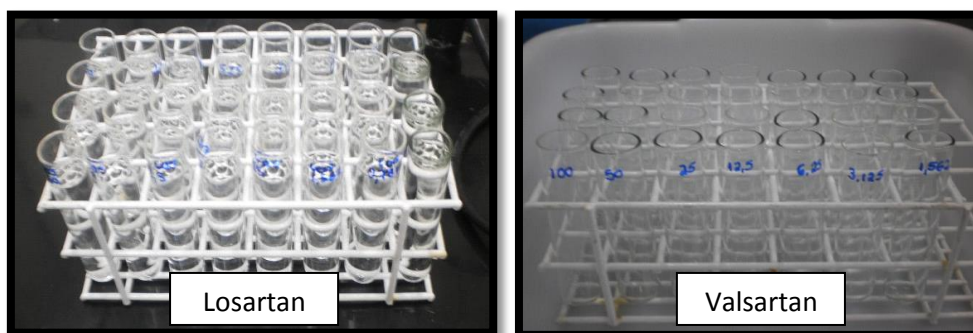


Figura 12 – Diluições dos fármacos Losartan e do Valsartan.

Em cada réplica foram adicionados 300 ovos e após esse procedimento, o experimento foi mantido em uma câmara incubadora com temperatura controlada de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 a 16 horas de luz, por um período de 24 horas. As variáveis físico-químicas estavam dentro dos padrões de aceitabilidade do método. A tabela 5 apresenta os parâmetros e condições para a avaliação de efeito crônico com ouriço-do-mar.

TABELA 5 . Parâmetros e condições para avaliação de efeito crônico (embriolarval) com *L. variegatus*.

Parâmetros	Condições
Temperatura	25 ± 2 °C
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água do mar natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	24 a 28 horas
Recipiente-teste	Tubos de ensaios com capacidade de 15 mL
Volume das soluções-teste	10 mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por mL	30
Idade do organismo-teste	Ovos com no máximo 30 minutos após a confirmação de 80% de fecundação
Efeito observado	Anormalidade ou retardo no desenvolvimento embriolarval
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de larvas <i>pluteus</i> normais no controle
Alimentação	Sem

Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2012).

A partir do controle foi retirada uma alíquota para verificar se pelo menos 80 % das larvas atingiram o estágio de *pluteus*. Após a verificação desse estágio, o ensaio foi encerrado com 0,5 mL de formol tamponado com bórax. A leitura dos resultados foi realizada com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, onde os 100 primeiros organismos foram analisados e o grau do desenvolvimento estabelecido foram os embriões normais ou retardados

(anormais), como demonstra a figura 13, onde é possível observar as diferenças no desenvolvimento dos braços do embrião normal e anormal.



Figura 13 - Desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* (10x e 40x).

Fonte: COELHO (2013).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o uso do *software* *ICPIN* (USEPA, 1988) foram obtidos os valores estimados de CI_{50} (Concentração de Inibição média) e também de IC (Intervalo de Confiança) superior e inferior. A partir desses valores, foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, para os ensaios agudos do Losartan e Valsartan.

Nos ensaios de toxicidade crônica com os fármacos Losartan e Valsartan foi utilizado o *software* *TOXTAT 3.5* (WEST & GULLEY, 1996) para obter os valores de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e de CEO (Concentração de Efeito Observado). Para obter os valores estimados de CI_{50} e de IC superior e inferior foi utilizado o *software* *ICPIN* (USEPA, 1988). Foram calculados também a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

4. RESULTADOS

4.1 LOSARTAN

4.1.1 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM LOSARTAN

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (taxa de fertilização) com Losartan (valores médios) estão apresentados na figura 14. Na tabela 6 estão os valores de CI_{50} , a média, DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação) e os IC (intervalos de confiança) superiores e inferiores.

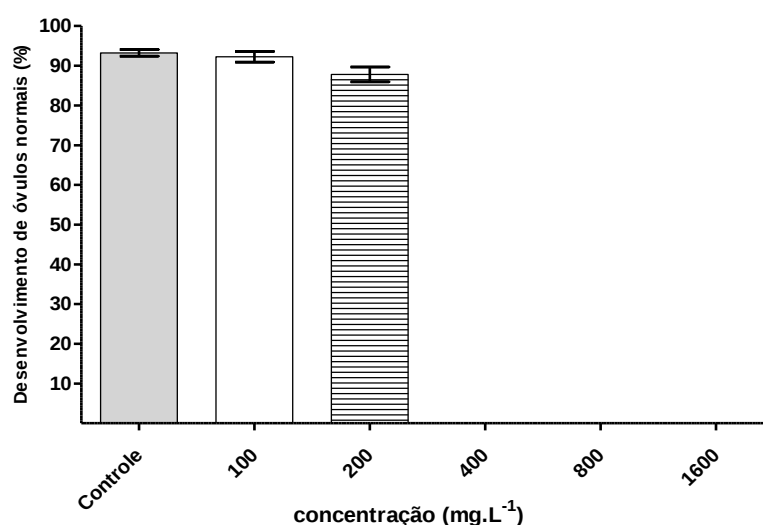


Figura 14. Valores médios de toxicidade aguda (taxa de fertilização) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Losartan. Os valores expressos representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

TABELA 6 – Resultados dos ensaios de fertilização (toxicidade aguda) de *L. variegatus* frente à exposição ao Losartan (CI_{50} e intervalos de confiança)

ENSAIO	CI_{50} (mg.L ⁻¹)	IC SUPERIOR (mg.L ⁻¹)	IC INFERIOR (mg.L ⁻¹)
1	290,61	296,84	282,60
2	294,32	300,00	285,37
3	293,88	297,04	288,10
MÉDIA	292,93	---	---
DP	1,65	---	---
CV	0,56	---	---

CI_{50} = Concentração Inibitória 50%; IC= Intervalo de Confiança; DP = Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

No ensaio 1 de fertilização do Losartan, o valor do CENO foi de 100 mg.L⁻¹ e o do CEO foi de 200 mg.L⁻¹. Nos ensaios 2 e 3 não houveram efeitos.

4.1.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA COM LOSARTAN

Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica (embriolarval) com Losartan estão apresentados na figura 15, com os valores médios de três ensaios crônicos. Na tabela 7 estão os valores de CI₅₀, a média, DP (desvio padrão), CV (coeficiente de variação), o IC (intervalos de confiança) superiores e inferiores, o CENO (concentração de efeito não observado) e o CEO (concentração de efeito observado).

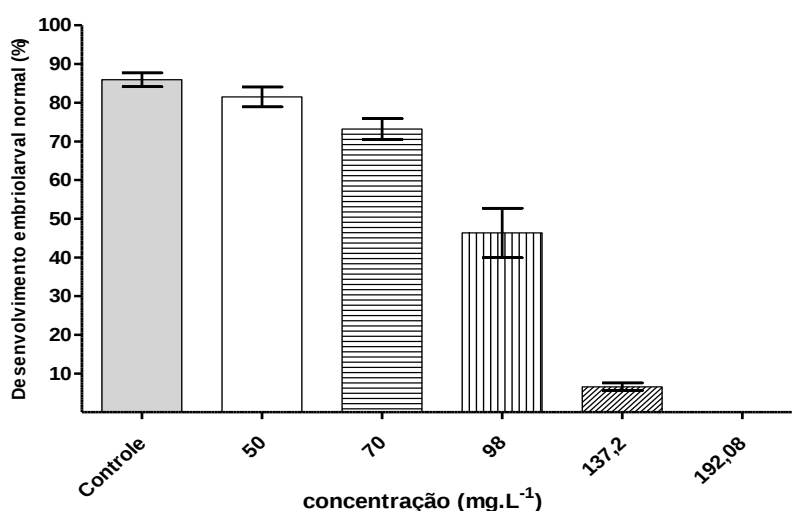


Figura 15. Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Losartan. Os valores expressos representam a média ± erro padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

TABELA 7 – Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval (toxicidade crônica) de *L. variegatus* frente à exposição ao Losartan (CI₅₀ e intervalos de confiança)

ENSAIO	CEO (mg.L ⁻¹)	CENO (mg.L ⁻¹)	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	IC SUPERIOR (mg.L ⁻¹)	IC INFERIOR (mg.L ⁻¹)
1	70	50	95,31	100,66	90,29
2	70	50	87,02	90,18	84,92
3	70	50	114,51	115,75	112,59
MÉDIA	70	50	98,94	---	---
DP	---	---	11,51	---	---
CV (%)	---	---	11,63	---	---

CEO= Concentração de Efeito Observado CENO=Concentração de Efeito Não Observado; CI50=Concentração Inibitória 50%; IC=Intervalo de Confiança; CV= Coeficiente de Variação.

4.2 VALSARTAN

4.2.1 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

O fármaco Valsartan foi solubilizado inicialmente em DMSO a partir de 100 mg.L^{-1} , e posteriormente em água reconstituída com sais, no entanto, não foi possível solubilizar em concentrações maiores que este valor. Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com Valsartan (taxa de fertilização) estão apresentados na figura 16 (valores médios).

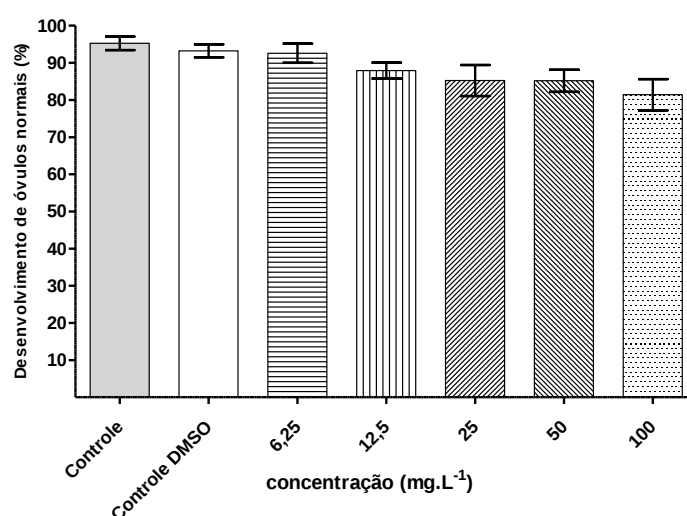


Figura 16. Valores médios de toxicidade aguda (taxa de fertilização) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Valsartan. Os valores expressos representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada ($n=3$ com 4 réplicas).

Nos ensaios 1 e 2 de fertilização do Valsartan, os valores do CENO foram de $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$, e do CEO foram de $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$. No ensaio 3, o CEO foi de $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e não houve CENO, pois a concentração de efeito observado foi menor que $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$. Na figura 8 são demonstrados os resultados de fertilização, com valores de CENO, CEO, média, DP e CV.

TABELA 8 – Resultados dos ensaios de fertilização (toxicidade aguda) de *L. variegatus* frente à exposição ao Valsartan (CENO e CEO).

ENSAIO	CEO (mg.L ⁻¹)	CENO (mg.L ⁻¹)
1	12,5	6,25
2	12,5	6,25
3	6,25	---
MÉDIA	10,41	4,16
DP	2,94	2,94
CV (%)	28,24	70,67

CEO= Concentração de Efeito Observado CENO=Concentração de Efeito Não Observado; CV= Coeficiente de Variação.

4.2.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA

Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica com Valsartan (taxa de desenvolvimento embriolarval normal) estão apresentados na figura 17 (valores médios) e na tabela 9 (CENO, CEO, Cl₅₀ e intervalos de confiança).

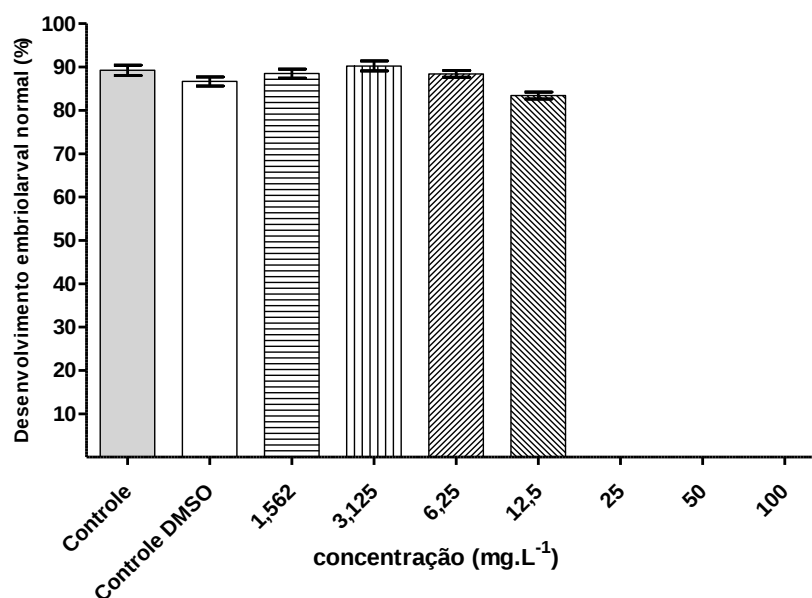


Figura 17. Valores médios de toxicidade crônica (desenvolvimento embriolarval normal) de *L. variegatus* frente à exposição a diferentes concentrações de Valsartan. Os valores expressos representam a média ± erro padrão para cada concentração testada (n=3 com 4 réplicas por ensaio).

TABELA 9 – Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval (toxicidade crônica) de *L. variegatus* frente à exposição ao Valsartan (CENO, CEO, CI_{50} e intervalos de confiança).

ENSAIO	CEO (mg.L ⁻¹)	CENO (mg.L ⁻¹)	CI_{50} (mg.L ⁻¹)	IC SUPERIOR (mg.L ⁻¹)	IC INFERIOR (mg.L ⁻¹)
1	25	12,5	18,54	18,75	18,30
2	25	12,5	18,01	18,12	17,89
3	6,25	3,12	18,13	18,29	17,99
MÉDIA	18,75	9,37	18,22	---	---
DP	8,83	4,42	0,22	---	---
CV (%)	47,09	47,17	1,20	---	---

CEO= Concentração de Efeito Observado CENO=Concentração de Efeito Não Observado; CI_{50} =Concentração Inibitória 50%; IC=Intervalo de Confiança; CV= Coeficiente de Variação.

5. DISCUSSÃO

A produção e uso do Losartan e Valsartan no tratamento da hipertensão podem resultar na sua liberação para o meio ambiente através de múltiplas vias como os sistemas de esgoto. Se lançados na água, não se espera que a volatilização seja um importante processo para estas substâncias, com base nos valores obtidos para a Constante de Henry dos dois fármacos ($<5 \times 10^{-5}$ atm.m³/mol) (tabela 6), sendo consideráveis solúveis, e tendem a permanecerem na água (Morrison, 1999). Em ambiente aquático, ambos os fármacos tendem a serem adsorvidos por partículas sólidas suspensas e sedimento, baseado nos valores obtidos para a constante de adsorções em solo (Koc) (tabela 6) (Swan et al., 1983; Site, 2001). A partir das estimativas de biodegradação calculados pelo programa BIOWIN (Interface EPI SUITE), os dois fármacos não apresentam taxas de rápida biodegradação, persistindo no ambiente, possibilitando a ação biológica em organismos não-alvos (tabela 6).

Estima-se que os ouriços-do-mar, modelo adotado para avaliação ecotoxicológica no presente estudo, possuem 23.300 genes com representantes de quase todas as famílias dos genes dos vertebrados, embora muitas vezes as famílias não sejam tão grandes quanto àquelas encontradas em vertebrados (SEA URCHIN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). No ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* já foi descrito um gene que codifica uma enzima (like) conversora de angiotensina (NCBI, 2014; Tu et al., 2012), embora a função fisiológica da angiotensina e o seu(s) respectivo(s) receptor(es) neste organismo, constituindo então prováveis alvos moleculares para os fármacos Losartan e Valsartan, ainda seja desconhecida.

Apesar de ambos os fármacos terem sido projetados para atuação no mesmo alvo molecular (receptor AT1 para Ang II) as diferenças observadas para os valores de CENO e CEO poderiam ser justificadas pelas diferenças nos valores de K_{ow} para as duas moléculas, aonde se observam efeitos para o Valsartan, cujo valor de $\log K_{ow}$ é de 3,65, em concentrações inferiores deste fármaco, enquanto os valores superiores observados para CENO e CEO nos ensaios com o Losartan poderiam ser um reflexo do seu baixo valor de $\log K_{ow}$, que é de 3,01.

Dados relacionados à farmacocinética são de fundamental importância para a avaliação do risco ambiental dos fármacos. Dentre os conceitos associados a esta linha farmacológica encontram-se os valores de K_{ow} . Sabe-se que, a partir destes valores, é possível correlacionar os parâmetros farmacocinéticos de uma molécula, tais como absorção, distribuição, metabolização e excreção no organismo humano, bem como a propriedade de bioacumulação em organismos aquáticos, contribuindo deste modo para análises ecotoxicológicas. De acordo com esta visão, fármacos que apresentam maiores valores de K_{ow} possuem maior efeito bioacumulativo, aumentando deste modo, a possibilidade da geração de danos ecotoxicológicos. Estas informações podem ser visualizadas nos ensaios realizados (Tabela 7 e 9), onde o fármaco Valsartan, que possui maior valor de K_{ow} quando comparado ao Losartan, demonstra menores valores de CENO e CEO. Tais dados podem confirmar a hipótese de que Valsartan apresentaria maior risco de danos ambientais quando comparado com a Losartan.

De maneira similar, estudos ecotoxicológicos realizados com outros modelos revelaram diferenças na sensibilidade aos efeitos adversos dos dois fármacos como os ensaios realizados com o peixe *Oncorhynchus mykiss* observando-se os efeitos tóxicos como valores de $CL_{50\ 96h}$ para o Losartan $> 929\text{ mg.L}^{-1}$ e para o Valsartan $CL_{50\ 96h}$ foi $> 100\text{ mg.L}^{-1}$. Já os valores de CENO $_{96h}$ do Losartan foi de 929 mg.L^{-1} e do Valsartan o valor do CENO $_{96h}$ para este mesmo peixe foi de 100 mg.L^{-1} , demonstrando uma maior sensibilidade deste organismo para o Valsartan em relação ao Losartan, corroborando com os dados obtidos no presente estudo (FDA-CDER, 2002; FDA-CDER, 2009).

No sentido de contribuir com as informações sobre a toxicidade dos fármacos Losartan e Valsartan para os organismos marinhos, os compostos foram classificados de acordo com a diretiva 93/67/CEE (CEC, 1996), de acordo com os resultados pontuais de toxicidade. Conforme a classificação apresentada na tabela 2. Diante disso, no ensaio de toxicidade agudo com o fármaco Losartan ($Cl_{50} = 292,93\text{ mg.L}^{-1}$), este poderia ser classificado como “Não Tóxico”. Nos ensaios de toxicidade crônica com os fármacos Losartan

($Cl_{50} = 98,94 \text{ mg.L}^{-1}$) e Valsartan ($Cl_{50} = 18,22 \text{ mg.L}^{-1}$), estes poderiam ser classificados como “Nocivos”.

Relacionando os dados obtidos a partir dos ensaios ecotoxicológicos com a presença de resíduos destes fármacos em ambiente aquático relatados até o presente momento, é improvável a ocorrência de efeitos adversos agudos e crônicos dos fármacos Losartan e Valsartan em ambiente aquático marinho, pois as concentrações de efeitos tanto agudos como crônicos para estes dois fármacos são superiores às concentrações já relatadas no ambiente (na faixa de ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$), entretanto, ainda é necessário conhecer mais a respeito destes compostos no ambiente, assim como o destino e sua transformação.

Ainda existe uma lacuna no que diz respeito aos produtos gerados a partir do metabolismo humano e que são lançados nos sistemas de esgoto como produtos de excreção (urina e fezes), tanto em relação às suas concentrações ambientais quanto aos efeitos em organismos não-alvos (ecotoxicológicos). O principal metabólito gerado a partir do metabolismo do losartan é um metabólito 5-carboxílico denominado de EXP-3174, que apresenta atividade farmacológica 10 vezes mais potente em relação ao losartan (Pharmacogenomics Knowledge Base¹, 2014; Whirl-Carrillo, 2012). Através do uso da interface EPI SUITE (EPA, 2012), estima-se que o metabólito EXP-3174 apresenta valor de log Kow superior ao losartan (log Kow 4,81 para EXP-3174 vs. log Kow 3,01 do losartan potássico), e que a molécula também apresenta a característica de persistência no ambiente, não sendo rapidamente biodegradado no ambiente. A notação SMILES do metabólito EXP-3174 necessária para os cálculos foi obtida através do banco de dados SPIDERCHEM (Royal Society of Chemistry³, 2014). Em relação ao metabolismo do Valsartan, seu principal metabólito 4-hidroxi valsartan é farmacologicamente inativo (Pharmacogenomics Knowledge Base², 2014; Whirl-Carrillo, 2012).

Adicionalmente, deve-se considerar também às possíveis alterações bioquímicas/moleculares do losartan e do valsartan em organismos aquáticos, levando em consideração às similaridades de enzimas responsáveis pela metabolização destes compostos às enzimas presentes em células de

mamíferos. Estudos em modelos humanos revelaram que o valsartan é primariamente metabolizado em 4-OH valsartan, reação catalisada pela CYP2C9, e a reação de biotransformação do losartan em seu metabólito ativo EXP 3174 envolve duas isoformas da citocromo p450: CYP3A4 e CYP2C9 (Pharmacogenomics Knowledge Base^{1,2}, 2014; Whirl-Carrillo, 2012). As enzimas das famílias CYP1, CYP2, CYP3, and CYP4 estão envolvidas na biotransformação oxidativa de substâncias químicas em produtos mais hidrofílicos. O ouriço-do-mar apresenta 120 CYP genes, e aqueles relacionados às famílias CYP1 a 4 constituem 80% deste total, o que sugere que houve uma pressão seletiva em expandir funcionalmente estas famílias de genes (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006). Alterações em nível de expressão ou atividade da CYP450 poderiam indicar alterações celulares ou ainda serem utilizados como biomarcadores de exposição a estes fármacos.

Em vista destes fatos, apesar das concentrações de efeito observadas para losartan e valsartan no presente estudo serem superiores às concentrações ambientais reportadas até a presente data, novos estudos que visam à análise dos efeitos dos metabólitos e as concentrações ambientais de ambos os fármacos assim como a investigação dos mecanismos de toxicidade são necessários para um melhor entendimento da dinâmica destes compostos em ecossistemas aquáticos.

6. CONCLUSÕES

No ensaio agudo do Losartan em ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* o valor da CI_{50} média estimada foi de $292,93 \text{ mg.L}^{-1}$, podendo ser classificado como “Não Tóxico” pela diretiva 93/67/CEE, que classifica substâncias de acordo com os resultados pontuais de toxicidade. Os valores encontrados para os efeitos agudos para o fármaco Valsartan encontram-se acima de 100 mg.L^{-1} , podendo este também classificado como “Não Tóxico” pela diretiva 93/67/CEE.

No ensaio crônico do fármaco Losartan em ouriços-do-mar o valor médio estimado de CI_{50} foi de $98,94 \text{ mg.L}^{-1}$ e para o fármaco Valsartan a média estimada de CI_{50} foi de $18,22 \text{ mg.L}^{-1}$, diferenças que podem ser justificadas pelos valores de K_{ow} destes fármacos. Podendo ser classificados como “Nocivos” pela diretiva 93/67/CEE.

É improvável a ocorrência de efeitos adversos agudos e crônicos destes fármacos no ambiente aquático marinho, pois as concentrações de efeitos são superiores às concentrações já relatadas em ambiente aquático. No entanto, novos estudos que visam à análise dos efeitos dos metabólitos e as concentrações ambientais de ambos os fármacos assim como a investigação dos mecanismos de toxicidade são necessários para um melhor entendimento da dinâmica destes compostos em ecossistemas aquáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia Aquática. - **Toxicidade agudo** - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro. NBR 12713, 2009.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – Ecotoxicologia Aquática – **Toxicidade crônica** – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro. NBR 13373, 2010.

ABNT NBR 15350 (2012) Associação Brasileira de Normas Técnicas Ecotoxicologia Aquática – **Toxicidade crônica de curta duração** – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). 21 p. 2012.

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade do Sistema Estuarino de Santos**. São Paulo: USP, 2002. 290 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Oceanografia, Área de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ARAGÃO, M. A. & ARAÚJO, R. P. A. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos**. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (Eds.). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos, S. P. Rima, p. 1-13, 2008.

BELLAS, J.; BEIRAS, R.; MARIÑO-BALSA, J. C.; FERNÁNDEZ, N. **Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species**. Ecotoxicology, 14 (3). p. 337-353, 2005.

BILA, D. M. & DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente**. Química Nova, v. 30 nº 3, 2007.

BLOPRESS – Bula para o profissional da saúde. 2013. Disponível em: <https://www.abbottbrasil.com.br/abbott/upload/bulario/1372873458blopress_profissional_anvisa_jul.13.pdf>. Acessado em: 24 de março de 2014.

BRASIL. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao consumo e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e**

dá outras providências. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acessado em: 11 de maio de 2013.

BRASIL. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acessado em: 15 de março de 2014.

BRASIL . Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2010: Anvisa, p. 922; 1279, Vol. II.

CAIRNS, J. JR. & NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological toxicity testing: scale, complexity and relevance.** Boca Raton, USA: Lewis Publisher, p. 228, 1995.

CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment.** Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, 1996.

CÉSAR, A.; SILVA, S. & SANTOS, A. **Testes de toxicidade aquática no controle da poluição:** Apostila UNISANTA, Universidade Santa Cecília, Santos, S.P. Brasil, 4 ed. 1997.

COELHO, F. R. **Caracterização físico-química, microbiológica e ecotoxicológica das águas dos canais de drenagem urbana de Santos (São Paulo, Brasil).** Santos: UNISANTA, 2013. 69 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ecologia, área de Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Universidade Santa Cecília, Santos, 2013.

COONEY, J. D. **Freshwater tests.** In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. (RAND, G. M. ed.). Boca Raton, Florida: CRC PRESS. 1125 p. 1995.

CORTEZ, F. S. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos**. São Paulo: USP, 2011. 218 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências, área de Tecnologia Nuclear – Materiais, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

COSTA, C. R. OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. Química Nova, v. 31 nº 7 p. 1820-1830, 2008.

FARIA, A. S.; KIPERSTOK, A.; MEDEIROS, Y. D. P.; BERETTA, M. **Aproximação dos conceitos de gestão de recursos hídricos e produção limpa, utilizando a abordagem gestão de demanda**. [I Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental, I COBESA; 7, 2010, Bahia; Brasil]. (Artigo).

FDA – U. S. Food and Drugs administration. CDER - **Center for drug evaluation and research**. Approach Package for: Application number 20-386/S-019 and 029. Environment Assessment/Fonsi. p.8. 2002 Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/20-86S019_Cozaar_EAFONSI.pdf>. Acesso em: 02 de out. 2013.

FDA – U. S. Food and Drugs administration. CDER - **Center for drug evaluation and research**. Application number 22-217 Environment Assessment. p.8. 2009.

FICK, J.; LINDBERG, R. H.; PARKKONEN, J.; ARVIDSSON, B.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D. G. J. Therapeutic levels of Levonorgestrel detected in blood plasma of fish: Results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. **Environmental Science & Technology**, 44. p. 2661-2666. 2010.

GESAMP – Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. **A Sea of Troubles**. IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP. Rep. Stud. GESAMP n. 70. 35 p. 2001.

GRACÍA-LOR, E.; MARTÍNEZ, M.; SANCHO, J. V.; PEÑUELA, G.; HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high

performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 99. p. 1011-1023. 2012.

GRUNG, M.; KÄLLQVIST, T.; SAKSHAUG, S.; SKURTVEIT, S.; THOMAS, K. V. **Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline**. Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 71. n° 2. p. 328-340. 2008.

GUIMARÃES, L. L.; PEREIRA, C. D.S.; CORTEZ, F. S.; TOMA, W.; CHOUERI, R. B.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R.; CÉSAR, A. **Determinação de fármacos na área de influência do emissário submarino de Santos, S.P.** [Apresentado ao 12º Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, **ECOTOX**; 12, 2012, Pernambuco; Brasil]. (Pôster).

HERMERS, J. L. M.; DE BRUIJN, J. H. M. & BROOKE, D. N. The octanol-water partition coefficient: Strengths and limitations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 32. (4). p. 732-733. 2013.

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

HSDB – Hazardous Substances Data Bank. **Toxnet**. Toxicology Data Network. 2013. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2014.

JOLLEY, D. F.; O'BRIEN, G.A. & MORRISON, R. J. **Evaluation of chemical contaminant and toxicology studies, part 1 – an overview**. South Pacific Journal of Natural Science, 21 p. 1-5, 2003.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, 43. p. 363-380. 2009.

KELLY, J. R. & HARWELL, M. A. **Indicators of ecosystem response and recovery**. In: LEVIN, S. A.; HARWELL, M. A.; KELLY, J. R.; KIMBALL, K. D. (Eds.) Ecotoxicology: Problems and Approaches. New York: Springer – Verlag, p. 8-40, 1989.

KHETAN, S. K. & COLLINS, T. J. **Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry.** Chemical Review, v. 107 nº 6, p. 2319-2364, 2007.

KLOSTERHAUS, S. L.; GRACE, R.; HAMILTON, M. C.; YEE, D. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface water, sediments, and mussels in an urban estuary. **Environment International**, 54. p. 92-99. 2013.

LARSSON, D. G.; PEDRO, C. PAXAEUS, N. **Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals.** Journal of Hazardous Materials. 148. P. 751-755, 2007.

MACHADO, C. J. S. **Recursos hídricos e cidadania no Brasil: Limites, alternativas e desafios.** Ambiente & Sociedade, v. 6 nº 2 p. 121-136, 2003.

MAGALHÃES, D. P. & FERRÃO FILHO, A. S. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Oecologia Brasiliensis, v. 12 nº 3 p. 355-381, 2008.

MORAES, D. S. L. & JORDÃO, B. Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana.** Revista de Saúde Pública, v. 36 nº 3, p. 370-4, 2002.

MORRINSON, R.D..Environmental Forensics: Principles and Applications. CRC Press LLC, Florida, USA, 1999.

MSDS – MATERIAL SAFETY DATA SHEET MICARDIS – 2011. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/system/msds/DB00966.pdf?1265922747>. Acessado em: 20 de março de 2014.

NARVAEZ, J. F. V. & JÍMENEZ, C. C. **Pharmaceutical products in the environment: Sources, effects and risks.** Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmaceutica, v. 19 nº 1, p. 93-108, 2012.

NCBI (**National Center for Biotechninology Information**). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/765056>>. Acessado em: 05 de janeiro de 2014.

NÖDLER, K.; HILLEBRAND, O.; IDZIK, K.; STRATHMANN, M.; SCHIPERSKI, F.; ZIRLEWAGEN, J.; LICHA, T. Occurrence and fate of the angiotensin II receptor antagonist transformation product Valsartan acid in the water cycle – A comparative study with selected β -blockers and the persistent anthropogenic wastewater indicators carbamazepine and acesulfame. **Water Research** 47, p. 6650-6659. 2013.

OATES, J. A. **Antihypertensive agents and drug therapy of hypertension**. In Goodman and Gilman. Farmacologia. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, R.J. Mc Graw-Hill Companies, Inc., 9 ed. 1436 p. 1996.

OECD – Organization For Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. 201. p. 25. 2011. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en>. Acessado em: 20 de março de 2014.

OECD – Organization For Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. *Daphnia magna* reproduction test. 211. p. 25. 2012. Disponível em: < http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en>. Acessado em: 20 de março de 2014.

OECD – Organization For Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. Fish, early-life stage toxicity test. 210. p. 24. 2013. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-210-fish-early-life-stage-toxicity-test_9789264203785-en>. Acessado em: 20 de março de 2014.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. **Combination of advanced oxidation process and biological treatment for wastewater decontamination – a review**. Science of the Total Environment, v. 409 nº 20 p. 4141-66, 2011.

PEREIRA, R. S. **Identificação e caracterização das fontes de poluição em Sistemas Hídricos**. Revista Eletrônica de Recursos Hídricos. IPH-UFRGS, v. 1 nº 1, p. 20-36, 2004.

Pharmacogenomics Knowledge Base¹. Stanford University. <<http://www.pharmgkb.org/pathway/PA164713428#PGG>>. Acesso em 05 de abril de 2014.

Pharmacogenomics Knowledge Base². Stanford University. <<http://www.pharmgkb.org/drug/PA451848#tabview=tab3&subtab=31>>. Acesso em 05 de abril de 2014.

RAMOS, D.C. & CASALI, A. C. G. **Antagonistas dos receptores da angiotensina II: Uma revisão de classe**. Revista Saúde e Desenvolvimento, ano 1 nº 2 p. 80-94, 2012.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. & MCCARTHY, L. S. **Introduction to aquatic toxicology**. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. (RAND, G. M. ed.). Boca Raton, Florida: CRC PRESS. 1125 p. 1995.

REBOUÇAS, A. **Uso inteligente da água**. São Paulo: Escrituras Editora. 207 p. 2004.

Royal Society of Chemistry¹. **SPIDERCHEM. ChemSpider ID: 54768**. <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54768.html>>. Acesso em 05 de abril de 2014.

Royal Society of Chemistry². **SPIDERCHEM. ChemSpider ID: 54833**. < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54833.html?rid=881abab4-e99b-4e9d-b7f0-947360fcd967>> Acesso em 05 de abril de 2014.

Royal Society of Chemistry³. **SPIDERCHEM. ChemSpider ID: 97264**. < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.97264.html?rid=6625b1ae-c906-4681-8fb8-1474445f264c>>. Acesso em 06 de abril de 2014

SDS – Safety Data Sheet - AstraZeneca – 2013. Disponível em: <<http://www.astrazeneca.com.au/healthcare-professionals/material-safety-data-sheets>>. Acessado em: 10 de março de 2014.

SDS – Safety Data Sheet - AstraZeneca – 2011. Disponível em: <<http://www.astrazeneca.com.au/healthcare-professionals/material-safety-data-sheets>>. Acessado em: 10 de março de 2014.

SDS – Safety Data Sheet – USP (U.S. Pharmacopeial) – 2011. Disponível em: <<http://www.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1347700.pdf>>. Acessado em: 12 de março de 2014.

SANTOS, L. H. L. M.; GROS, M., RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DELERUE-MATOS, C.; PENA, A.; BARCELÓ, D.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, 461-462. p. 302-316. 2013.

SEA URCHIN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. **The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus***. Science. 314 (5801) p. 941-952. 2006.

SITE A.D. **Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review**. Phys. Chem. Ref. Data, v. 30, n^o. 1, 2001.

STRAYER, D. & DUDGEON, D. **Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges**. Journal of North American Benthological Society, v. 29 n^o 1, p. 344-358, 2010.

SWANN, R.L., LASKOWSKI, D. A., MCCALL, P. J., VANDER KUY K., DISHBURGER H. J. **A rapid method for the estimation of the environmental parameters octanol/water partition coefficient, soil sorption constant, water to air ratio, and water solubility**. Residue Reviews v. 85, p. 17-28, 1983

TERNES, T. A. **Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers**. Water Research, v. 32 n^o 11 p. 3245-3260, 1998.

The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th. Edition. O'Neil, M.J. (ed.). Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001.

TOSCO, P.; ROLANDO, B.; FRUTTERO, R.; HENCHOZ, Y.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; GASCO, A. **Physicochemical profiling of sartans: A detailed study of ionization constants and distribution coefficients.** Helvetica Chimica Acta. 91. p. 468-482. 2008.

TU, Q.; ANDREW CAMERON, R.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A.; DAVIDSON, E. H. **Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpurantus* based on transcriptome analysis.** Genome Research. 22 p. 2079-2087. 2012.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 — **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. p. 579, 2002.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **EPI Suite® v.4.11.** The Estimation Programs Interface. (2012).

USEPA. **An interpolation estimate for chronic toxicity: The Icp approach.** Norberg-King, T. J. Technical Report 05-88, National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN 55804. 1988.

USEPA¹. U.S. Environmental Protection Agency. **EPI Suite® v.4.11.** The Estimation Programs Interface.. <<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>>. Acesso em 15 de setembro de 2012.

USEPA². U. S. Environmental Protection Agency <<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>> .Acesso em 15 de setembro de 2012

VENTURA, C. R. R.; VERÍSSIMO, I.; LIMA, R. N. P.; BARCELLOS, C. F.; OIGMAN-PSZCZOL, S. S. **Echinodermata.** In: Biodiversidade marinha da Baía

da Ilha Grande. Org. Joel C. Creed; Débora O. Pires e Marcia A. de O. Figueiredo. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 416 p. 2007.

YAMAMOTO, N. S.; PEREIRA, C. D. S.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, H.; SANTOS, A. R.; GUIMARÃES, L. L. **Avaliação dos efeitos biológicos do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (CRUSTACEA, CLADOCERA).** Unisanta BioScience. 1 (2). p. 49-53. (2002).

WELTIMAN, R.; BRANDS, C. M. J.; CORRAL, E.; DESMARES-KOOPMANS, M. J. E.; MIGCHIESEN, M. H. J.; OUDHOFF, K. A.; DE ROODE, D. F. Assessment of the environmental fate and effects of azilsartan, a selective antagonist of angiotensin II type 1. **Chemosphere**, 87. p. 1323-1329. 2012.

WEST, Inc. & GULLEY, D. Western Ecosystems Technology. **TOXTAT 3.5** Computer Program. 1996.

WHIRL-CARRILLO M.,. MCDONAGH E.M, HEBERT J. M., GONG L., SANGKUHL K., THORN C.F.,. ALTMAN R.B.,. KLEIN T.E. **Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine** Clinical Pharmacology & Therapeutics 92 (4): 414-417, 2012.

ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia.** In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (Eds.). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos, S. P. Rima, p. 1-13, 2008.

8. ANEXOS

ANEXO A - Relatório gerado pela Interface EPI SUITE para o fármaco LOSARTAN POTÁSSICO

EPI Suite Results For CAS 124750-99-8

SMILES : OCc1c(CL)nc(CCCC)n1Cc2ccc(c3ccccc3c4nn(K)nn4)cc2
 CHEM : Losartan Potassium
 MOL FOR: C22 H22 CL1 N6 O1 K1
 MOL WT : 461.01

----- EPI SUMMARY (v4.11) -----

Physical Property Inputs:

Log Kow (octanol-water): -----
 Boiling Point (deg C) : -----
 Melting Point (deg C) : -----
 Vapor Pressure (mm Hg) : -----
 Water Solubility (mg/L): -----
 Henry LC (atm-m3/mole) : -----

Log Octanol-Water Partition Coef (SRC):
 Log Kow (KOWWIN v1.68 estimate) = 3.01

Boiling Pt, Melting Pt, Vapor Pressure Estimations (MPBPVP v1.43):

Boiling Pt (deg C): 883.38 (Adapted Stein & Brown method)
 Melting Pt (deg C): 349.84 (Mean or Weighted MP)
 VP(mm Hg,25 deg C): 1.64E-026 (Modified Grain method)
 VP (Pa, 25 deg C) : 2.19E-024 (Modified Grain method)
 Subcooled liquid VP: 8.4E-023 mm Hg (25 deg C, Mod-Grain method)
 : 1.12E-020 Pa (25 deg C, Mod-Grain method)

Water Solubility Estimate from Log Kow (WSKOW v1.42):

Water Solubility at 25 deg C (mg/L): 3.382
 log Kow used: 3.01 (estimated)
 no-melting pt equation used

Water Sol Estimate from Fragments:

Wat Sol (v1.01 est) = 1.0226 mg/L

ECOSAR Class Program (ECOSAR v1.11):

Class(es) found:
 Benzyl Alcohols
 Imidazoles

Henrys Law Constant (25 deg C) [HENRYWIN v3.20]:

Bond Method : Incomplete
 Group Method: Incomplete
 For Henry LC Comparison Purposes:
 User-Entered Henry LC: not entered
 Henrys LC [via VP/WSol estimate using User-Entered or Estimated values]:
 HLC: 2.941E-027 atm-m3/mole (2.980E-022 Pa-m3/mole)
 VP: 1.64E-026 mm Hg (source: MPBPVP)
 WS: 3.38 mg/L (source: WSKOWWIN)

Log Octanol-Air Partition Coefficient (25 deg C) [KOAWIN v1.10]:

Can Not Estimate (can not calculate HenryLC)

Probability of Rapid Biodegradation (BIOWIN v4.10):

Biowin1 (Linear Model) : 0.6856
 Biowin2 (Non-Linear Model) : 0.1864
 Expert Survey Biodegradation Results:
 Biowin3 (Ultimate Survey Model): 2.4414 (weeks-months)
 Biowin4 (Primary Survey Model) : 3.4022 (days-weeks)
 MITI Biodegradation Probability:
 Biowin5 (MITI Linear Model) : -0.3808
 Biowin6 (MITI Non-Linear Model): 0.0006
 Anaerobic Biodegradation Probability:

Biowin7 (Anaerobic Linear Model): -0.6786
 Ready Biodegradability Prediction: NO

Hydrocarbon Biodegradation (BioHCwin v1.01):
 Structure incompatible with current estimation method!

Sorption to aerosols (25 Dec C) [AEROWIN v1.00]:
 Vapor pressure (liquid/subcooled): 1.12E-020 Pa (8.4E-023 mm Hg)
 Log Koa (): not available
 Kp (particle/gas partition coef. (m3/ug)):
 Mackay model : 2.68E+014
 Octanol/air (Koa) model: not available
 Fraction sorbed to airborne particulates (phi):
 Junge-Pankow model : 1
 Mackay model : 1
 Octanol/air (Koa) model: not available

Atmospheric Oxidation (25 deg C) [AopWin v1.92]:
 Hydroxyl Radicals Reaction:
 OVERALL OH Rate Constant = 50.9415 E-12 cm3/molecule-sec
 Half-Life = 0.210 Days (12-hr day; 1.5E6 OH/cm3)
 Half-Life = 2.520 Hrs
 Ozone Reaction:
 No Ozone Reaction Estimation
 Fraction sorbed to airborne particulates (phi):
 1 (Junge-Pankow, Mackay avg)
 not available (Koa method)
 Note: the sorbed fraction may be resistant to atmospheric oxidation

Soil Adsorption Coefficient (KOCWIN v2.00):
 Koc : 5.699E+005 L/kg (MCI method)
 Log Koc: 5.756 (MCI method)
 Koc : 945 L/kg (Kow method)
 Log Koc: 2.975 (Kow method)

Aqueous Base/Acid-Catalyzed Hydrolysis (25 deg C) [HYDROWIN v2.00]:
 Rate constants can NOT be estimated for this structure!

Bioaccumulation Estimates (BCFBAF v3.01):
 Log BCF from regression-based method = 2.060 (BCF = 114.9 L/kg wet-wt)
 Log Biotransformation Half-life (HL) = -0.0739 days (HL = 0.8435 days)
 Log BCF Arnot-Gobas method (upper trophic) = 2.429 (BCF = 268.3)
 Log BAF Arnot-Gobas method (upper trophic) = 2.429 (BAF = 268.4)
 log Kow used: 4.01 (estimated)

Volatilization from Water:
 Henry LC: 2.94E-027 atm-m3/mole (calculated from VP/WS)
 Half-Life from Model River: 4.274E+023 hours (1.781E+022 days)
 Half-Life from Model Lake : 4.662E+024 hours (1.943E+023 days)

Removal In Wastewater Treatment:
 Total removal: 5.78 percent
 Total biodegradation: 0.12 percent
 Total sludge adsorption: 5.65 percent
 Total to Air: 0.00 percent
 (using 10000 hr Bio P,A,S)

Level III Fugacity Model:

Mass Amount (percent)	Half-Life (hr)	Emissions (kg/hr)	
Air	0.000377	5.04	1000
Water	2.78	900	1000
Soil	46.1	1.8e+003	1000
Sediment	51.1	8.1e+003	0

 Persistence Time: 3.55e+003 hr

ANEXO B - Relatório gerado pela Interface EPI SUITE para o fármaco VALSARTAN

EPI Suite Results For CAS 137862-53-4

SMILES : n1nnc(c3c(cccc3)c2ccc(CN(C(C(C)C)C(=O)(O))C(=O)(CCCC)cc2)n1
 CHEM : Valsartan
 MOL FOR: C24 H29 N5 O3
 MOL WT : 435.53

----- EPI SUMMARY (v4.11) -----

Physical Property Inputs:

Log Kow (octanol-water): -----
 Boiling Point (deg C) : -----
 Melting Point (deg C) : -----
 Vapor Pressure (mm Hg) : -----
 Water Solubility (mg/L): -----
 Henry LC (atm-m3/mole) : -----

Log Octanol-Water Partition Coef (SRC):
 Log Kow (KOWWIN v1.68 estimate) = 3.65

Boiling Pt, Melting Pt, Vapor Pressure Estimations (MPBPVP v1.43):

Boiling Pt (deg C): 674.38 (Adapted Stein & Brown method)
 Melting Pt (deg C): 294.05 (Mean or Weighted MP)
 VP(mm Hg,25 deg C): 8.18E-016 (Modified Grain method)
 VP (Pa, 25 deg C) : 1.09E-013 (Modified Grain method)
 Subcooled liquid VP: 8.07E-013 mm Hg (25 deg C, Mod-Grain method)
 : 1.08E-010 Pa (25 deg C, Mod-Grain method)

Water Solubility Estimate from Log Kow (WSKOW v1.42):

Water Solubility at 25 deg C (mg/L): 1.406
 log Kow used: 3.65 (estimated)
 no-melting pt equation used

Water Sol Estimate from Fragments:

Wat Sol (v1.01 est) = 21.933 mg/L

ECOSAR Class Program (ECOSAR v1.11):

Class(es) found:
 Amides -acid

Henrys Law Constant (25 deg C) [HENRYWIN v3.20]:

Bond Method : 1.82E-018 atm-m3/mole (1.84E-013 Pa-m3/mole)
 Group Method: Incomplete
 For Henry LC Comparison Purposes:
 User-Entered Henry LC: not entered
 Henrys LC [via VP/WSol estimate using User-Entered or Estimated values]:
 HLC: 3.334E-016 atm-m3/mole (3.378E-011 Pa-m3/mole)
 VP: 8.18E-016 mm Hg (source: MPBPVP)
 WS: 1.41 mg/L (source: WSKOWWIN)

Log Octanol-Air Partition Coefficient (25 deg C) [KOAWIN v1.10]:

Log Kow used: 3.65 (KowWin est)
 Log Kaw used: -16.128 (HenryWin est)
 Log Koa (KOAWIN v1.10 estimate): 19.778
 Log Koa (experimental database): None

Probability of Rapid Biodegradation (BIOWIN v4.10):

Biowin1 (Linear Model) : 0.9315
 Biowin2 (Non-Linear Model) : 0.8810
 Expert Survey Biodegradation Results:
 Biowin3 (Ultimate Survey Model): 2.8454 (weeks)
 Biowin4 (Primary Survey Model) : 4.0794 (days)
 MITI Biodegradation Probability:
 Biowin5 (MITI Linear Model) : -0.2176
 Biowin6 (MITI Non-Linear Model): 0.0024
 Anaerobic Biodegradation Probability:
 Biowin7 (Anaerobic Linear Model): -1.1260

Ready Biodegradability Prediction: NO

Hydrocarbon Biodegradation (BioHCwin v1.01):
Structure incompatible with current estimation method!

Sorption to aerosols (25 deg C) [AEROWIN v1.00]:
Vapor pressure (liquid/subcooled): 1.08E-010 Pa (8.07E-013 mm Hg)
Log Koa (Koawin est): 19.778
Kp (particle/gas partition coef. (m3/ug)):
Mackay model : 2.79E+004
Octanol/air (Koa) model: 1.47E+007
Fraction sorbed to airborne particulates (phi):
Junge-Pankow model : 1
Mackay model : 1
Octanol/air (Koa) model: 1

Atmospheric Oxidation (25 deg C) [AopWin v1.92]:
Hydroxyl Radicals Reaction:
OVERALL OH Rate Constant = 42.7863 E-12 cm3/molecule-sec
Half-Life = 0.250 Days (12-hr day; 1.5E6 OH/cm3)
Half-Life = 3.000 Hrs
Ozone Reaction:
No Ozone Reaction Estimation
Fraction sorbed to airborne particulates (phi):
1 (Junge-Pankow, Mackay avg)
1 (Koa method)
Note: the sorbed fraction may be resistant to atmospheric oxidation

Soil Adsorption Coefficient (KOCWIN v2.00):
Koc : 2.263E+004 L/kg (MCI method)
Log Koc: 4.355 (MCI method)
Koc : 158.6 L/kg (Kow method)
Log Koc: 2.200 (Kow method)

Aqueous Base/Acid-Catalyzed Hydrolysis (25 deg C) [HYDROWIN v2.00]:
Rate constants can NOT be estimated for this structure!

Bioaccumulation Estimates (BCFBAF v3.01):
Log BCF from regression-based method = 0.500 (BCF = 3.162 L/kg wet-wt)
Log Biotransformation Half-life (HL) = -0.0251 days (HL = 0.9437 days)
Log BCF Arnot-Gobas method (upper trophic) = 2.333 (BCF = 215.3)
Log BAF Arnot-Gobas method (upper trophic) = 2.333 (BAF = 215.4)
log Kow used: 3.65 (estimated)

Volatilization from Water:
Henry LC: 1.82E-018 atm-m3/mole (estimated by Bond SAR Method)
Half-Life from Model River: 6.714E+014 hours (2.797E+013 days)
Half-Life from Model Lake : 7.324E+015 hours (3.052E+014 days)

Removal In Wastewater Treatment:
Total removal: 16.92 percent
Total biodegradation: 0.21 percent
Total sludge adsorption: 16.70 percent
Total to Air: 0.00 percent
(using 10000 hr Bio P,A,S)

Level III Fugacity Model:

Mass Amount (percent)	Half-Life (hr)	Emissions (kg/hr)	
Air	6.98e-005	6	1000
Water	14	360	1000
Soil	76.9	720	1000
Sediment	9.12	3.24e+003	0

Persistence Time: 855 hr