



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Faculdade de Engenharia

Ludmila da Silva Cunha

**Toxicidade crônica, embriotoxicidade e análise de risco ambiental  
de antivirais**

Rio de Janeiro

2022

Ludmila da Silva Cunha

**Toxicidade crônica, embriotoxicidade e análise de risco ambiental de antivirais**



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele Maia Bila

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Natália Guimarães de Figueiredo

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

C972 Cunha, Ludmila da Silva.  
Toxicidade crônica, embriotoxicidade e análise de risco ambiental de antivirais / Ludmila da Silva Cunha. – 2022.  
175f.

Orientadora: Daniele Maia Bila.  
Coorientadora: Natália Guimarães de Figueiredo.  
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Toxicologia ambiental - Teses. 3. Medicamentos - Teses. 4. Agentes antivirais - Teses. 5. Impacto ambiental - Avaliação - Teses. I. Bila, Daniele Maia. II. Figueiredo, Natália Guimarães de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 504.5:615.281.8

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

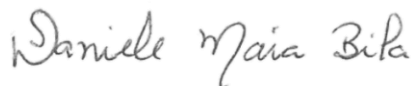
Ludmila da Silva Cunha

**Toxicidade crônica, embriotoxicidade e análise de risco ambiental de antivirais**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental – Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em 20 de maio de 2022.

Banca Examinadora:



---

Professora Dr<sup>a</sup> Daniele Maia Bila (Orientadora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ



---

Professora Dr<sup>a</sup> Natália Guimarães de Figueiredo (Coorientadora)  
Instituto Nacional de Tecnologia – INT



---

Professor Dr. André Luís de Sá Salomão  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ



---

Professora Dr<sup>a</sup>. Bárbara Rodrigues Geraldino de Andrade  
Instituto Nacional do Câncer – INCA



---

Professora Dr<sup>a</sup>. Kátia Soares da Poça  
Instituto Nacional do Câncer – INCA



---

Dr<sup>a</sup>. Sarah Dario Alves Daflon  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Rio de Janeiro

2022

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar todas as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu irmão Artur e principalmente aos meus pais Cunha e Lucinea que sempre estiveram ao meu lado. O apoio e suporte de vocês foram fundamentais durante esses quatro anos de doutorado. Durante toda a minha formação acadêmica, desde a graduação até hoje, eles se mostraram presentes e participativos, vibrando a cada conquista minha. Sou grata a DEUS por todos os ensinamentos, cada palavra de incentivo, por tudo que fizeram por mim!!!! Amos vocês!!!!

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Daniele Maia Bila que aceitou essa minha empreitada no doutorado e que sempre esteve de prontidão por email e whatsapp para sanar minhas dúvidas, dar mais ideias para o trabalho, corrigir o paper, assinar documentos e tantas outras coisas, agradeço imensamente pelo carinho e apoio nos momentos de desespero. Obrigada pela oportunidade concedida a mim de desenvolver este trabalho, por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional e por toda a dedicação que a Sr<sup>a</sup> tem com os seus alunos. A Sr<sup>a</sup> é um exemplo como pessoa!

A minha co-orientadora Natália Guimarães de Figueiredo, pelas contribuições que muito enriqueceram este trabalho e o artigo. Meu muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental (DEAMB) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e a todo o seu corpo docente que acrescentaram substancialmente na minha formação acadêmica.

Aos professores André Luís de Sá Salomão, Bárbara Rodrigues Geraldino de Andrade, Kária Soares da Poça e a pesquisadora Sarah Dario Alves Daflon por aceitarem participar da banca.

Ao meu querido Agape Mattos, mais que um aluno de Iniciação Científica, mais que um amigo, praticamente meu anjo da guarda desde o dia que nos conhecemos em 2017. A minha trajetória não seria a mesma sem a sua presença.

A todos os meus colegas do Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) pelos momentos de alegria, risadas, desabafos e ajuda.

A todos que de alguma forma contribuíram na produção dessa tese, nem que fosse simplesmente com pensamentos positivos e motivacionais. E principalmente ao Dionízio, meu amigo e companheiro de vida, por toda dedicação e paciência comigo. Cada choro, você multiplicou em sorrisos. Não foi fácil chegar até aqui, seu apoio e presença foram essenciais. Obrigada por todo o carinho e por sempre me incentivar a buscar o meu melhor.

Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor.

*Paulo Freire*

## RESUMO

CUNHA, Ludmila da Silva. *Toxicidade crônica, embriotoxicidade e análise de risco ambiental de antivirais*. 2022. 175f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Os antivirais são uma classe de medicamentos usados no tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras infecções virais. Devido ao seu amplo uso em países em desenvolvimento, esses compostos já foram encontrados em diversos ambientes aquáticos e os dados sobre o risco que podem representar para espécies não-alvo são escassos. Este estudo tem como objetivo avaliar o risco ambiental de antivirais e seus efeitos crônicos utilizando duas espécies de organismos aquáticos, além de investigar a embriotoxicidade destes fármacos para *Daphnia similis*. Os resultados de toxicidade com *R. subcapitata* foram: zidovudina ( $CI_{50} = 5,442 \text{ mg L}^{-1}$ ) < aciclovir ( $CI_{50} = 3,612 \text{ mg L}^{-1}$ ) < lamivudina ( $CI_{50} = 3,013 \text{ mg L}^{-1}$ ) < efavirenz ( $CI_{50} = 0,034 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os resultados do ensaio crônico com *C. dubia* demonstraram que a zidovudina foi a menos tóxica ( $CE_{50} = 5,671 \text{ mg L}^{-1}$ ), seguida pelo aciclovir ( $CE_{50} = 3,062 \text{ mg L}^{-1}$ ), lamivudina ( $CE_{50} = 1,345 \text{ mg L}^{-1}$ ) e efavirenz ( $CE_{50} = 0,026 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ambas as espécies demonstraram ser sensíveis ao efavirenz. A análise de risco ambiental nas águas superficiais dos rios revelou ser alto (Quociente de Risco > 1) com o uso do efavirenz e lamivudina para *R. subcapitata* e *C. dubia*. Posteriormente, foi realizada uma avaliação de risco para misturas de antivirais que identificou riscos muito altos para os organismos aquáticos. Os resultados do ensaio de embriotoxicidade dos quatro antivirais revelaram que esses fármacos induziram anormalidades variadas como interrupção do desenvolvimento embrionário e anormalidades na carapaça, antenas e do espinho caudal. O modelo de embrião de *Daphnia* foi considerado adequado para avaliar a toxicidade de micropoluentes durante o desenvolvimento embrionário o que pode comprometer à sobrevivência de espécies em ambientes com a presença dos antivirais. Os antivirais representam um risco ambiental significativo para os organismos aquáticos e devem ser levados em consideração no monitoramento futuro dos corpos hídricos.

Palavras-chave: Antivirais. *Ceriodaphnia Dubia*. *Raphidocelis Subcapitat*. Toxicidade crônica. Análise de risco ambiental. Embriotoxicidade.



## ABSTRACT

CUNHA, Ludmila da Silva. *Chronic toxicity, embryotoxicity and environmental risk analysis of antivirals*. 2022. 175f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Antiviral drugs are class of medications used to treat the human immunodeficiency virus (HIV) and other viral infections. Due to their wide use in developing countries, these compounds have already been reported in several aquatic environments, while data on the risk they may pose to non-target species are scarce. This study aims to evaluate the environmental risk of antivirals and their chronic effects using two species of aquatic organisms, in addition to investigating the embryotoxicity to *Daphnia similis*. The results with *R. subcapitata* showed the following toxicities: zidovudine ( $Cl_{50} = 5.442 \text{ mg L}^{-1}$ ) < acyclovir ( $Cl_{50} = 3.612 \text{ mg L}^{-1}$ ) < lamivudine ( $Cl_{50} = 3.013 \text{ mg L}^{-1}$ ) < efavirenz ( $Cl_{50} = 0.034 \text{ mg L}^{-1}$ ). The results of the chronic bioassay with *C. dubia* demonstrated that zidovudine is the least toxic ( $CE_{50} = 5.671 \text{ mg L}^{-1}$ ), followed by acyclovir ( $CE_{50} = 3.062 \text{ mg L}^{-1}$ ), lamivudine ( $CE_{50} = 1.345 \text{ mg L}^{-1}$ ) and efavirenz ( $CE_{50} = 0.026 \text{ mg L}^{-1}$ ). Both species have been shown to be sensitive to efavirenz. A risk quotient (RQ) was calculated, and efavirenz had an RQ greater than 1 for both species, and lamivudine had an RQ greater than 1 for *C. dubia*, representing a high ecological risk for these organisms. Subsequently, a risk assessment was performed for antiviral mixtures identified as presenting relatively high risks to aquatic organisms. The results of the embryotoxicity assay of the four antivirals revealed that these drugs induced various abnormalities such as interruption of embryonic development and abnormalities in the carapace, antennae and caudal spine. The *Daphnia* embryo model was considered adequate to assess toxicity during embryonic development, which may compromise the survival of species in environments with the presence of antivirals. Antivirals pose a significant environmental risk to aquatic organisms and must be taken into account in future monitoring of water bodies.

Keywords: Antivirals. *Ceriodaphnia Dubia*. *Raphidocelis Subcapitata*. Chronic toxicity. Environmental risk analysis. Embryotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas de exposição ambiental de fármacos residuais.....	22
Figura 2	Etapas realizadas no processo de Extração em Fase Sólida.....	24
Figura 3	Mecanismo de ação do fármaco aciclovir nas células infectadas pelo vírus da herpes.....	42
Figura 4	Timidina (esquerda), AZT (direita) .....	44
Figura 5	Mecanismo de ação do fármaco zidovudina nas células infectadas pelo HIV.....	45
Figura 6	Etapas da fase farmacocinéticas.....	46
Figura 7	Anatomia e morfologia do cladóceros, <i>Daphnia</i> .....	53
Figura 8	Ciclo de vida de <i>Daphnia similis</i> .....	54
Figura 9	Cladóceros, <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	55
Figura 10	Microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	56
Figura 11	Esquema dos experimentos com base nos ensaios ecotoxicológicos.....	59
Figura 12	Foto dos bécheres com cultivo de <i>Daphnia similis</i> em incubadora no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ.....	64
Figura 13	Bécheres com cultivo do organismo-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i> mantido no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ.....	66
Figura 14	Bécheres com cultivo da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> mantida no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ.....	68
Figura 15	Embriões na câmara incubadora de <i>Daphnia</i> .....	69
Figura 16	Etapas do desenvolvimento embrionário normal de <i>Daphnia</i> .....	70
Figura 17	Inibição do crescimento de algas <i>R. subcapitata</i> expostas aos fármacos aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina.....	80
Figura 18	Respostas reprodutiva de <i>C. dubia</i> expostas por 8 dias ao aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina.....	83
Figura 19	Espécies predominantes de aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina, respectivamente, em pH 7.....	85
Figura 20	Sensibilidade dos organismos-teste aos antivirais efavirenz, lamivudina, aciclovir e zidovudina.....	89

Figura 21	Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de <i>D. similis</i> a concentrações de aciclovir.....	96
Figura 22	Embriões de <i>Daphnia</i> expostos ao Aciclovir em 96 horas (a) controle, (b) 4 mg L <sup>-1</sup> , (c) 2 mg L <sup>-1</sup> , (d) 1 mg L <sup>-1</sup> , (e) 0,5 mg L <sup>-1</sup> , (f) 0,25 mg L <sup>-1</sup> .....	96
Figura 23	Anomalias resultantes da exposição de embriões de <i>D. similis</i> a concentrações de efavirenz em 96 horas (a) controle, (b) 25 µg L <sup>-1</sup> , (c) 12,5 µg L <sup>-1</sup> , (d) 6,25 µg L <sup>-1</sup> , (e) 3,12 µg L <sup>-1</sup> , (f) 1,5 µg L <sup>-1</sup> , (g) 0,8 µg L <sup>-1</sup> , (h) 0,2 µg L <sup>-1</sup> , (i) 0,1 µg L <sup>-1</sup> , (j) 0,05 µg L <sup>-1</sup> .....	98
Figura 24	Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de <i>D. similis</i> a concentrações de efavirenz.....	100
Figura 25	Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de <i>D. similis</i> a concentrações de lamivudina.....	101
Figura 26	Desenvolvimento embrionário de <i>D. similis</i> exposta à lamivudina em 96 horas (a) controle, (b) 2 mg L <sup>-1</sup> , (c) 1 mg L <sup>-1</sup> , (d) 0,5 mg L <sup>-1</sup> , (e) 0,25 mg L <sup>-1</sup> , (f) 0,125 mg L <sup>-1</sup> .....	102
Figura 27	Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de <i>D. similis</i> a concentrações de zidovudina.....	104
Figura 28	Desenvolvimento embrionário de <i>D. similis</i> exposta à zidovudina em 96 horas (a) controle, (b) 4 mg L <sup>-1</sup> , (c) 2 mg L <sup>-1</sup> , (d) 1 mg L <sup>-1</sup> , (e) 0,5 mg L <sup>-1</sup> , (f) 0,25 mg L <sup>-1</sup> .....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classes de contaminantes emergentes.....	21
Tabela 2	Cartuchos de SPE mais utilizados e seus principais fabricantes.....	25
Tabela 3	Métodos de extração e detecção de antivirais em diferentes amostras ambientais.....	27
Tabela 4	Categorias dos antirretrovirais e seus compostos.....	30
Tabela 5	Compilação das ocorrências e concentrações dos antivirais em diferentes matrizes ambientais.....	32
Tabela 6	Estrutura molecular e propriedades físico-químicas dos antivirais.....	40
Tabela 7	Propriedades farmacológicas e farmacocinéticas dos antivirais.....	47
Tabela 8	Especificação de reagentes utilizados nos ensaios.....	60
Tabela 9	Especificação da instrumentação utilizada.....	61
Tabela 10	Número CAS dos compostos determinados, nome IUPAC, marca e pureza.....	62
Tabela 11	Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição para <i>D. similis</i> .....	63
Tabela 12	Composição do meio L. C. Oligo para cultivo de <i>R. subcapitata</i> .....	65
Tabela 13	Toxicidade crônica dos antivirais para o organismo <i>R. subcapitata</i> .....	79
Tabela 14	Toxicidade crônica dos antivirais para o organismo <i>C. dubia</i> .....	82
Tabela 15	Análise de risco ambiental para os antivirais.....	90
Tabela 16	RQ <sub>MEC/PNEC</sub> , RQ <sub>STU</sub> e sua razão, com base na toxicidade crônica.....	93
Tabela 17	Efeitos de poluentes ambientais no desenvolvimento embrionário de <i>Daphnia sp.</i> .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3TC	Lamivudina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACV	Aciclovir
ARVs	Antirretrovirais
AZT	Zidovudina
CE	Concentração Efetiva
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CE	Contaminantes emergentes
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massa em série
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
EFS	Extração em Fase Sólida
EFV	Efavirenz
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
MEC	Concentração ambiental medida
PEC	Concentração ambiental prevista
PNEC	Concentração ambiental sem efeito
PFCPs	Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais
RQ	Quociente de risco
STU	Soma das Unidades Tóxicas
VHS	Vírus Herpes simples
VVZ	Vírus Varicella zoster
VEB	Vírus Epstein Barr
CMV	Citomegalovírus

## LISTA DE ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
$\mu\text{g L}^{-1}$	Micrograma por litro
$\text{mg L}^{-1}$	Miligrama por litro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
Kow	Coeficiente de partição octanol-água
pKa	Constante de Dissociação Ácida

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
1.1.	<b>Objetivo Geral</b> .....	18
1.2.	<b>Objetivos Específicos</b> .....	18
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1.	<b>Contaminantes emergentes</b> .....	19
2.2.	<b>Métodos de extração e identificação dos contaminantes emergentes em matrizes ambientais</b> .....	22
2.2.1.	<u>Extração em Fase Sólida</u> .....	23
2.2.2.	<u>Cromatografia Gasosa</u> .....	25
2.2.3.	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</u> .....	26
2.3.	<b>Antivirais</b> .....	29
2.4.	<b>Propriedades físico-químicas e mecanismo de ação dos antivirais</b> ....	39
2.4.1.	Aciclovir.....	41
2.4.2.	Efavirenz.....	43
2.4.3.	Lamivudina.....	43
2.4.4.	Zidovudina.....	44
2.5.	<b>Farmacocinética dos antivirais</b> .....	46
2.6.	<b>Ecotoxicologia</b> .....	49
2.7.	<b>Ensaio de toxicidade</b> .....	50
2.7.1.	<u>Ensaio de toxicidade crônica</u> .....	50
2.7.2.	<u>Embriotoxicidade com <i>Daphnia similis</i></u> .....	51
2.8.	<b>Organismos-teste</b> .....	51
2.8.1.	<u><i>Daphnia similis</i></u> .....	52
2.8.2.	<u><i>Ceriodaphnia dubia</i></u> .....	54
2.8.3.	<u><i>Raphidocelis subcapitata</i></u> .....	56
2.9.	<b>Análise de Risco Ambiental</b> .....	57
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	59
3.1.	<b>Reagentes e padrões</b> .....	60
3.2.	<b>Limpeza das vidrarias</b> .....	62

3.3.	<b>Cultivo e manutenção dos organismos-teste</b> .....	63
3.3.1	<u>Cultivo de <i>Daphnia similis</i></u> .....	63
3.3.2	<u>Cultivos de algas para alimentação de <i>D. similis</i></u> .....	64
3.3.3	<u>Cultivo de <i>Ceriodaphnia dubia</i></u> .....	66
3.3.4	<u>Cultivo de <i>Raphidocelis subcapitata</i></u> .....	67
3.4.	<b>Ensaio ecotoxicológicos</b> .....	68
3.4.1.	<u>Ensaio de embriotoxicidade com <i>D. similis</i></u> .....	68
3.4.2.	<u>Ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i></u> .....	71
3.4.3.	<u>Ensaio de toxicidade crônica com <i>Raphidocelis subcapitata</i></u> .....	72
3.5.	<b>Análise de risco ambiental</b> .....	75
3.6.	<b>Análise de risco ambiental de misturas</b> .....	76
3.7.	<b>Análises estatísticas dos ensaios de toxicidade</b> .....	77
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	78
4.1.	<b>Resultados do ensaio crônico com <i>Raphidocelis subcapitata</i></b> .....	78
4.2.	<b>Resultados do ensaio crônico com <i>Ceriodaphnia dubia</i></b> .....	81
4.3.	<b>Discussão dos dados de toxicidade crônica</b> .....	84
4.4.	<b>Análise de risco ambiental</b> .....	89
4.5.	<b>Análise de risco ambiental para mistura de antivirais</b> .....	92
4.6.	<b>Embriotoxicidade dos antivirais</b> .....	95
4.6.1.	<u>Aciclovir</u> .....	95
4.6.2.	<u>Efavirenz</u> .....	97
4.6.3.	<u>Lamivudina</u> .....	100
4.6.4.	<u>Zidovudina</u> .....	103
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	111
6.	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	113
7.	<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	114
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	116
	<b>ANEXO 1 - PROTOCOLO DO ENSAIO DE EMBRIOTOXICIDADE</b> .....	144
	<b>ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NA WATER AND SCIENCE TECHNOLOGY</b> .....	148



## INTRODUÇÃO

Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs) pertencem a uma das principais categorias de contaminantes emergentes (CE) presentes no ambiente. CE são substâncias que ainda não foram classificadas como poluentes prioritários e, portanto, não são rotineiramente monitorados (GEISSEN et al. 2015; VERGILI et al., 2019). Os PFCPs foram encontrados na faixa de  $\text{mg L}^{-1}$  nas águas residuais da indústria farmacêutica e na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  e  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas águas residuais hospitalares e domésticas (VERGILI e GENCDAL, 2017; YILMAZ et al., 2017; EDWARDS et al., 2018).

Os medicamentos antivirais pertencem uma classe de contaminantes emergentes ambientais (PRASSE et al., 2010; ABAFE et al., 2018; K'OREJE et al., 2018; HORN et al., 2022), cujo impacto ambiental ainda é relativamente desconhecido, apesar de seu alto consumo nas últimas duas décadas (KUDU et al., 2022). Embora a avaliação de risco com relação aos efeitos adversos e limites permissíveis de exposição a organismos não tenham sido ainda definidos, há uma crescente preocupação científica, pública e regulatória uma vez que esses compostos já foram detectados em águas superficiais e na água potável (NGUMBA et al., 2016; ABAFE et al., 2018; HORN et al., 2022).

A descarga indiscriminada de antivirais no meio ambiente pode ter efeitos adversos na biota dos ecossistemas aquáticos (ADEOLA e FORBES, 2021; HORN et al., 2022). A liberação ambiental destes compostos é de considerável preocupação devido aos potenciais efeitos ao ecossistema e ao desenvolvimento de resistências virais (HORN et al., 2022).

A principal rota de entrada de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos domésticos, tratados ou não, em corpos hídricos. No entanto, também devem ser considerados os efluentes de indústrias farmacêuticas, efluentes rurais e a disposição inadequada de fármacos após expiração do prazo de validade (MELVIN e LEUSCH, 2016; SPIELMEYER et al., 2017). A remoção ineficiente de antivirais durante o tratamento de águas residuais é uma das principais razões pelas quais essa classe de CE é detectada em águas superficiais e potável (ADEOLA e FORBES, 2021; KUDU et al., 2022).

O ambiente aquático recebe uma mistura complexa de contaminantes químicos, o próprio uso de fármacos para soropositivos é considerado uma combinação de antirretrovirais (ARVs), a terapia inicial deve sempre incluir combinações de três antirretrovirais, como primeira linha de tratamento, o esquema de terapia inicial deve ser efavirenz (EFV), lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF), onde alguns casos pode-se substituir o tenofovir pela zidovudina (AZT), ou seja, os fármacos escolhidos para esse estudo são os mais utilizados em países em desenvolvimento (KUDU et al., 2022). Além do mais, sabe-se que indivíduos soropositivos apresentam episódios de herpes recorrente indicando a necessidade do uso do aciclovir em conjunto com a terapia antirretroviral (PANNERSELVAM et al., 2022).

De acordo o último Boletim do Ministério da saúde (2020), no período compreendido de 1980 a junho de 2020, foram identificados 1.011.617 casos de AIDS no Brasil, em 2019, o país diagnosticou 41.909 novos casos de HIV e 37.308 casos de AIDS. Neste contexto, fármacos para soropositivos como a zidovudina onde cerca de 72-74% é excretado na urina como metabólitos e 14-18% como droga inalterada (WILBY et al., 2016) e alguns estudos a detectou em águas superficiais (K'OREJE et al., 2016; PRASSE et al., 2010; WOOD et al., 2015), ressalta-se a importância em identificar os efeitos ecotoxicológicos. Mesmo que as concentrações individuais de antivirais em ambientes aquáticos possam ser baixas, as concentrações combinadas podem resultar em toxicidade significativa para organismos aquáticos.

Alguns antivirais são (altamente) bioativos, afetando negativamente organismos não-alvos e persistindo em ambientes aquáticos (JAIN et al., 2013; KUDU et al., 2022). Caso o medicamento antiviral e o vírus a ser tratado ocorram concomitantemente no mesmo corpo d'água, cepas de resistência poderão ser desenvolvidas. Isso acelera o estabelecimento de resistência antiviral e limita a utilidade clínica dos antivirais em humanos e animais (SINGER et al., 2014; ADEOLA e FORBES, 2021). Os antivirais também podem ser tóxicos e, de acordo com QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), os dados de modelagem e toxicidade ocupam o oitavo lugar entre as classes terapêuticas mais perigosas para organismos aquáticos, como algas, daphnias e peixes (KUDU et al., 2022).

Neste contexto, no presente estudo, quatro antivirais com uso difundido no país: aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina foram analisados com a finalidade

de elucidar a toxicidade aquática, embriotoxicidade e análise de risco ambiental. Para a maioria das listas de prioridades de produtos químicos levam-se em consideração os riscos que estes podem trazer aos ecossistemas e a saúde pública, baseando-se nas avaliações de risco de cada composto (GUILLÉN et al., 2012). A escassez de dados sobre os efeitos adversos do antivirais impede uma elaboração de priorização de monitoramento desses compostos, uma vez que as características de contaminantes diferem entre um país e outro. Ressalta-se a relevância deste estudo em identificar os efeitos tóxicos e embriotóxicos dos antivirais em organismos aquáticos, uma vez que é preocupante a quantidade desses compostos que potencialmente entram no ambiente.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral, avaliar o risco ambiental do aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina e seus efeitos crônicos utilizando duas espécies de organismos aquáticos, além de investigar a embriotoxicidade destes fármacos para *Daphnia similis*.

### 1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade crônica dos antivirais aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina utilizando o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e a microalga *Raphidocelis subcapitata* como espécies indicadoras;
- Analisar o risco ambiental dos antivirais isolados e em mistura por meio de duas abordagens: uma com base nas razões MEC/PNEC ( $RQ_{MEC/PNEC}$ ) e a outra com base em unidades tóxicas ( $RQ_{STU}$ );
- Avaliar o efeito embriotóxico dos antivirais através do ensaio de embriotoxicidade com *Daphnia similis*;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Contaminantes emergentes

Nos últimos anos, a detecção de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PFCPs) em ambientes aquáticos urbanos em concentrações ambientalmente relevantes desencadearam maior atenção e uma quantidade considerável de literatura relacionada à ocorrência, toxicidade, risco ambiental e tecnologias de tratamento (KIM e HOMAN, 2020; NGUMBA et al., 2020). O uso extensivo e de longo prazo de fármacos na medicina humana e veterinária, o crescimento populacional e o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, representam uma ameaça potencial para os corpos hídricos (WANG et al., 2018; LETSINGER et al., 2019).

Os PFCPs foram detectados em diversas matrizes ambientais desde águas residuais tratadas (DEBLONDE et al., 2011; VERGEYNST et al., 2015), águas superficiais (VERGEYNST et al., 2014; HORN et al., 2022), águas subterrâneas (LAPWORTH et al., 2012; SPIELMEYER et al., 2017) e água potável (KIM e HOMAN, 2020). Estudos na literatura relataram que os resíduos farmacêuticos no ambiente aquático induzem efeitos ecotoxicológicos, desregulação endócrina, resistência bacteriana e viral (SINGER et al., 2014; CARUSSO et al., 2018; LUJA-MONDRAGÓN et al., 2019).

Está bem estabelecido que uma das principais vias de entrada de produtos farmacêuticos no meio ambiente é por meio de descargas de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (KÜMMERER, 2009; DUAN et al., 2020). Áreas com saneamento deficiente e/ou nenhuma ETAR centralizada cujos efluentes são liberados diretamente para ambientes aquáticos e terrestres formam uma significativa rota de entrada PFCPs para o ambiente aquático (NGUMBA et al., 2016a; K'OREJE et al., 2016; HORN et al., 2022).

A ocorrência generalizada destes compostos em corpos d'água indica que as ETAR convencionais não foram projetadas especificamente para atingir altas eficiências de remoção de contaminantes emergentes, especialmente aqueles

reconhecidos como recalcitrantes, isto é, aqueles que não são degradados ou metabolizados por microrganismos (MOHAPATRA et al., 2016; TIWARI et al., 2017).

A Organização Norman Network (2016) definiu como contaminantes emergentes, substâncias detectadas no meio ambiente que atualmente não estão incluídas em programas de monitoramento ambiental de rotina e que podem ser candidatas à legislação futura devido a seus efeitos adversos e/ou persistência. Mais de 1000 substâncias, reunidas em 16 classes (toxinas de algas, agentes antiespumantes e complexantes, antioxidantes, detergentes, subprodutos de desinfecção, plastificantes, retardadores de chamas, fragrâncias, aditivos de gasolina, nanopartículas, substâncias perfluoroalquiladas, produtos de higiene pessoal, produtos farmacêuticos, pesticidas, anticorrosivos), são classificados como CE abordando seus efeitos ambientais e de saúde.

Como muitos contaminantes emergentes são moléculas projetadas, a diversidade de efeitos que podem causar é muito ampla. Alguns podem atuar como desreguladores endócrinos e afetar os processos hormonais de organismos aquáticos uma vez que todo o seu ciclo de vida fica em contato contínuo com essas substâncias na água. Outros são produzidos para terem efeitos biológicos no ser humano e podem gerar danos em organismos não-alvo mesmo em níveis muito baixos (ppb-ppt) (KHAN et al., 2022).

De acordo com Calvo-Flores et al. (2018), os contaminantes emergentes são formados por diferentes classes de compostos químicos e são categorizados com base em sua origem, uso, efeitos potenciais ou destino ambiental. Os grupos de substâncias identificadas como CEs estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classes de contaminantes emergentes.

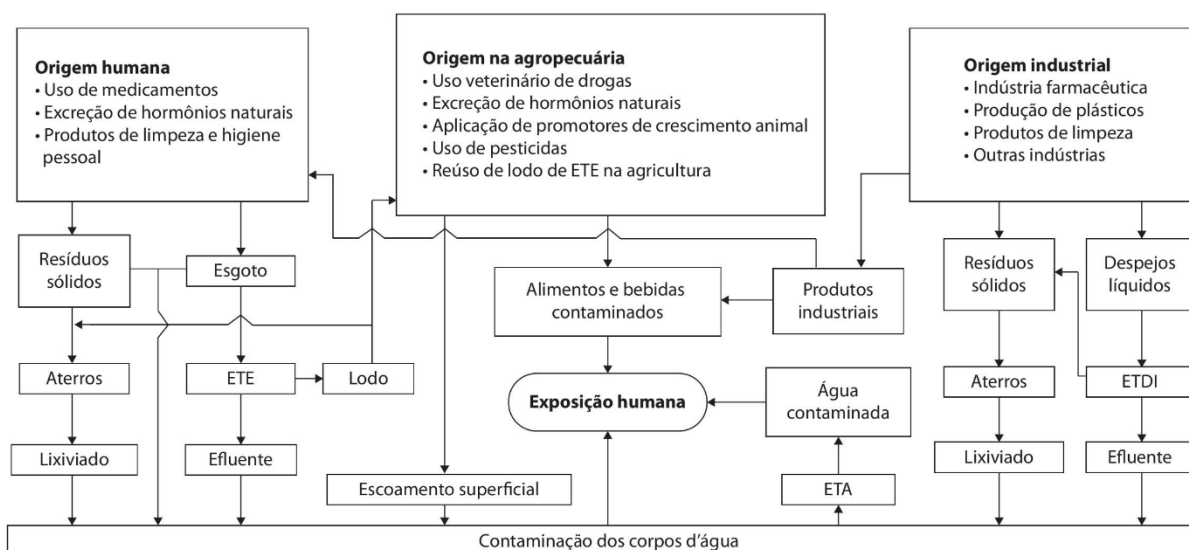
<b>Categoria</b>	<b>Compostos</b>
<b>Antibióticos (uso humano e veterinário)</b>	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol, amoxicilina, azitromicina
<b>Analgésicos e antiinflamatórios</b>	Codeína, ibuprofeno, paracetamol, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, aspirina
<b>Drogas psiquiátricas</b>	Diazepam, carbamazepina, lorazepam
<b>Reguladores lipídicos</b>	Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico, sinvastatina, enalapril
<b><math>\beta</math>-Bloqueadores</b>	Metoprolol, propanolol, timolol, bisoprolol
<b>Contrastes de Raios-X</b>	Iopromida, iopamidol, diatrizoato
<b>Esteróides e Hormônios</b>	Estradiol, estrona, estriol dietilestilbestrol
<b>Drogas de abuso</b>	Morfina, di-hidrocodeína, cocaína
<b>Fragâncias</b>	Almíscares macrocíclicos e nitro-derivados
<b>Protetores solares e repelentes</b>	Benzofenona, 3-(4 metilbenzilideno) cânfora
<b>Bactericidas</b>	Triclosan, 2-benzil 4-clorofenol
<b>Detergentes e metabólitos</b>	Etoxilato de alquilfenol, alquilfenóis (nonifenol e octilfenol), carboxilatos de alquilfenol
<b>Retardantes de chama</b>	Éteres difenil-polibromados, tetrabromo, bisfenol A, tris (2-cloroetil) fosfato
<b>Aditivos industriais</b>	Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos
<b>Aditivos de gasolina</b>	Dialquiléteres, metil-terc-butil-éter (MTBE)
<b>Subprodutos de desinfetantes</b>	Bromoácidos, bromoaldeídos, cianoformaldeídos
<b>Antioxidantes</b>	2,6-di-tert-butilfenol
<b>Anticorrosivos</b>	1H-Benzotriazol
<b>Compostos antifouling</b>	2,4,7,9-tetrametil-5-decin-4,7-diol
<b>Toxinas de algas</b>	Microcistinas
<b>Nanopartículas</b>	Dióxido de titânio
<b>Pesticidas</b>	Organofosforados, tiocarbamatos

Fonte: Adaptado de Calvo-Flores et al., 2018.

Os medicamentos veterinários, PFCPs domésticos e efluentes industriais/hospitalares são as três fontes mais comuns de contaminação do solo, corpos d'água superficiais e subterrâneos; outras fontes são os excrementos de gado, lixiviados de aterros sanitários, vazamentos de sistemas sépticos e de esgoto e descarga de efluentes de ETARs (SUI et al., 2015; PALMIOTTO et al., 2018).

A Figura 1 apresenta as principais rotas de contaminação de PFCPs no meio ambiente.

Figura 1 - Rotas de exposição ambiental de PFCPs



ETE e ETDI: Estações de Tratamento de Esgoto e de Despejos Industriais; ETA: Estação de Tratamento de Água

Fonte: Adaptado de Aquino et al., 2013.

## 2.2. Métodos de extração e identificação dos fármacos em matrizes ambientais

A maioria dos fármacos presente nos compartimentos ambientais frequentemente estão em concentrações traço ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\text{ng L}^{-1}$ ), o que torna difícil a quantificação. Alguns instrumentos analíticos não são sensíveis o suficiente para quantificá-los diretamente, exigindo um procedimento de concentração antes da análise (DANIELS et al., 2020). Devido à dificuldade de identificação dos contaminantes emergentes no meio ambiente, muitos métodos analíticos foram



desenvolvidos para quantificar essas substâncias em matrizes ambientais complexas, tais como águas superficiais e subterrâneas, esgoto doméstico, efluentes de ETE, sedimentos marinhos, solo e lodo biológico (SILVA e COLLINS, 2011).

O aperfeiçoamento de técnicas de detecção cromatográfica permitiu que pesquisadores quantificassem um grande número de fármacos no ambiente em níveis de  $\text{ng L}^{-1}$ , obrigando a comunidade científica a considerar esse tipo de contaminação como um potencial problema (ZUCCATO et al., 2006). Assim, metodologias analíticas foram desenvolvidas para detectar e quantificar antivirais em níveis extremamente baixos em corpos hídricos (na faixa de ppb a ppt) (MOMPELAT et al. 2009).

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, principalmente para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser adaptadas para as matrizes ambientais.

### 2.2.1. Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de preparação de amostras amplamente utilizada e recomendada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para extração de PFCPs em água e efluentes (ENGLERT, 2007). O princípio da EFS é semelhante ao da extração líquido-líquido (ELL), envolvendo uma partição de solutos entre duas fases. No entanto, em vez de duas fases líquidas imiscíveis, como na ELL, a EFS envolve a partição entre uma fase líquida (matriz da amostra) e uma fase sólida (sorvente). Esta técnica de tratamento de amostra permite a concentração e purificação de analitos da solução por sorção em um sorvente sólido.

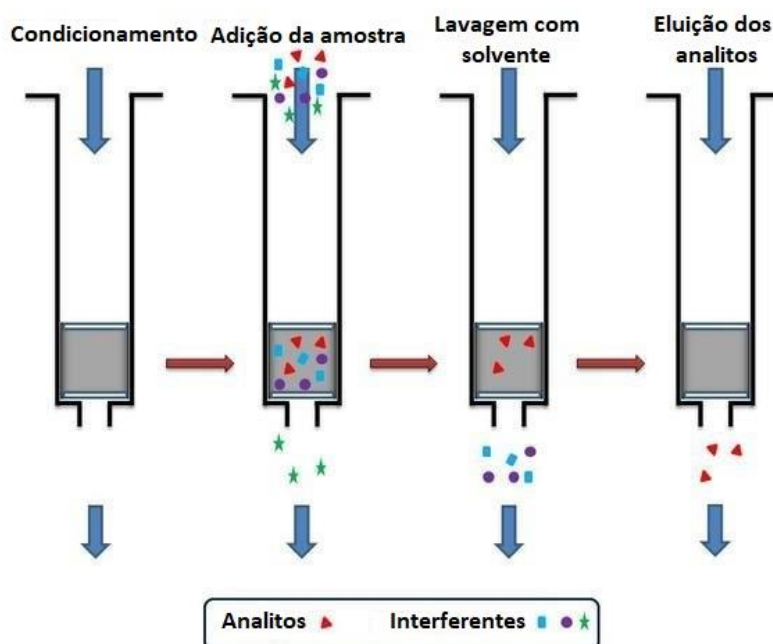
A extração em fase sólida utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para adsorver o analito que é então eluído com solvente específico. A EFS envolve etapas de condicionamento do cartucho com solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra, extração dos analitos da amostra, lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e eluição dos analitos de interesse para posterior análise (SILVA e COLLINS, 2011).

A abordagem básica envolve a percolação da amostra líquida por uma coluna, cartucho, tubo ou disco contendo um adsorvente que retém os analitos. Depois que

toda a amostra foi passada pelo sorvente, os analitos retidos são posteriormente recuperados após a eluição com um solvente apropriado (LIŠKA, 2000). Um procedimento típico de EFS é mostrado na Figura 2.

A escolha do tipo e quantidade de sorvente, volume de amostra e de solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos são alguns parâmetros que devem ser considerados (FARIA, 2004).

Figura 2 – Etapas realizadas no processo de Extração em Fase Sólida.



Fonte: Adaptado de AL-KARAWI, 2016

Atualmente, um grande número de adsorventes está disponível comercialmente, sendo os mais utilizados em estudos com amostras ambientais estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Cartuchos de EFS mais utilizados e seus principais fabricantes.

<b>Cartuchos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Oasis LB</b>	Poli (divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)	Waters
<b>C18</b>	Sílica ligada polimericamente, octadecil (18% C)	Vários
<b>C18/ENV</b>	C18 hidroxilado poliestireno-divinilbenzeno	IST
<b>Florisil®</b>	Silicato de magnésio (Mg <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> )	Vários

Fonte: adaptado de MOREIRA, 2008.

### 2.2.2. Cromatografia gasosa

Para fazer a separação, detecção e quantificação dos analitos recorre-se geralmente a métodos cromatográficos, como a cromatografia em fase líquida e/ou a cromatografia em fase gasosa. A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica analítica com um excelente poder de resolução que possibilita a análise de várias substâncias em uma única amostra. Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra são dissolvidos em um solvente e vaporizados para separar os analitos distribuindo a amostra entre duas fases: uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel. A fase móvel é um gás quimicamente inerte que serve para transportar as moléculas do analito através da coluna aquecida (KAUR e SHARMA, 2018). A cromatografia não se restringe a separações analíticas. Pode ser utilizada na preparação de substâncias puras, no estudo da cinética de reações, investigações estruturais em escala molecular, determinação de constantes físico-químicas, incluindo entalpia, entropia e energia livre (GROB e BARRY, 2004). A grande limitação do método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

De acordo com GIGER (2009), as separações por cromatografia gasosa podem utilizar detectores universais como detector de ionização por chama (FID, flame ionization detector) ou ainda detectores de maior seletividade, como o detector por captura de elétrons (ECD, electron capture detector) ou detector de nitrogênio e fósforo (NPD, nitrogen-phosphorus detector). A detecção utilizando espectrômetro de massas (EM), e ionização por impacto de elétrons tornou-se a mais utilizada, devido aos excelentes limites de detecção e às possibilidades de utilização de

softwares de tratamento de dados com bibliotecas contendo milhares de espectros de massas para confirmação das estruturas dos compostos analisados (AZEVEDO et al., 2000).

### 2.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se desenvolveu muito nos últimos anos, principalmente na análise de produtos farmacêuticos em amostras ambientais aquosas.

A maioria das análises atuais por CLAE são realizadas empregando detecção por espectrofotometria por UV, fluorescência e espectrometria de massas (EM). As publicações recentes para quantificação de antivirais conforme mostrado na Tabela 3 têm empregado a detecção por EM, pois, os valores dos limites de detecção alcançados para detectores de UV são bem mais altos, na faixa de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  a  $\text{ng.L}^{-1}$ , comparados ao detector EM que atinge limites mais baixos de detecção ( $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\text{pg.L}^{-1}$ ). Quando utilizado o detector em série (EM/EM), oferece também, a possibilidade de confirmação dos compostos analisados (SILVA e COLLINS, 2011).

A Tabela 3 apresenta os principais métodos de extração e detecção de antivirais em diferentes matrizes ambientais. A informação apresentada na Tabela 3 permite verificar que o método de extração mais utilizado é o de extração em fase sólida (EFS) e o método instrumental de análise mais empregado foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectrometria de massas (CLAE-EM).

Tabela 3 - Métodos de extração e detecção de antivirais em diferentes amostras ambientais

<b>Antivirais</b>	<b>Extração</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Matriz ambiental</b>	<b>LDM (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Referências</b>
<b>Aciclovir</b>	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	1 (LQ)	85	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	2,5 (LQ)	66	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	6 (LQ)	42,1	PENG et al., 2014
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	13 (LQ)	42,1	PENG et al., 2014
<b>Efavirenz</b>	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	0,09	86	RIMAYI et al., 2018
	EFS	CG-EM	Lodo de ETE	7,8	109	SCHOEMAN et al., 2017
	Extração sortiva	CLAE-EM/EM	Água superficial	----	----	WOODING et al., 2017
	Extração assistida por microondas	CLUE-EM/EM	Efluente de ETE	160	98	MLUNGUZA et al., 2020
	EFS	CLUE-EM/EM	Água superficial	510	---	HORN et al., 2022
	EFS	CLUE-EM/EM	Eluente de ETE	590	---	MHUKA et al., 2020

<b>Lamivudina</b>	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	10 (LQ)	73	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	50 (LQ)	47	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	0,9	112	AMINOT et al., 2015
	Direta	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	20	36	ABAFE et al., 2018
	EFS	CLAE-EM/EM	Água subterrânea	3,22	---	FISHER et al., 2016
	EFS	CLAE-EM/EM	Água potável	2	---	FURLONG et al., 2017
	Direta	CLAE-EM/EM	Lixiviado de aterro	160	---	MASONER et al., 2014
	EFS	CLAE-EM/EM	Água de represa	13,4	20	WOOD et al., 2015
EFS	CLUE-EM/EM	Efluente te ETE	4910	---	MHUKA et al., 2020	
<b>Zidovudina</b>	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	1 (LQ)	50	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	5 (LQ)	54	PRASSE et al., 2010
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	6,3	110	AMINOT et al., 2015
	EFS	CLAE-EM/EM	Água superficial	7 (LQ)	73,2	PENG et al., 2014
	EFS	CLAE-EM/EM	Água de torneira	38,6	57	WOOD et al., 2015
	EFS	CLAE-EM/EM	Efluente de ETE	4	65	ABAFE et al., 2018

LDM: Limite de detecção do método; LQ: Limite de quantificação.

### 2.3. Antivirais

Segundo Horn et al. (2022), o consumo de antivirais vem aumentando devido a infecções pelo HIV e pandemias virais em todo o mundo. Por causa do alto número de pessoas vivendo com HIV na África do Sul, quantidades substanciais de antirretrovirais são consumidos e excretados. ARVs foram detectados globalmente em águas superficiais e efluentes e afluentes de ETAR. Os exemplos incluem Alemanha (PRASSE et al., 2010), Quênia (K'OREJE et al., 2016, 2018; NGUMBA et al., 2016a) e Finlândia (NGUMBA et al., 2016b). Alguns estudos também relatam sobre ARVs no ambiente aquático da África do Sul e em outros países africanos (WOOD et al., 2015; SCHOEMAN et al., 2015; WOODING et al., 2017; ROBSON et al., 2017; RIMAYI et al., 2018; ABAFE et al., 2018); no entanto, nem sempre são monitorados sistematicamente e os efeitos ecotoxicológicos permanecem desconhecidos.

Os antivirais só recentemente foram reconhecidas como contaminantes emergentes, e as estações de tratamento de águas residuais convencionais (ETARs) não foram projetadas para removê-los de forma eficiente (PRASSE et al., 2010; NGUMBA et al., 2016a; NANNOU et al., 2020). Apesar dos avanços nas tecnologias de tratamento de água, os efluentes continuam sendo uma fonte importante de carga antiviral devido às baixas eficiências de remoção (FUNKE et al., 2016).

Em 1981, a AIDS foi identificada como uma doença e dois anos após, iniciou-se uma intensa busca por fármacos que inibissem a replicação do vírus. O primeiro composto capaz de inibir a replicação do HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi a suramina, mas o primeiro agente anti-HIV a ser licenciado para uso clínico, em 1987, foi a zidovudina (AZT) (DE CLERCQ, 2009).

Os antirretrovirais (ARVs) são medicamentos usados no tratamento de infecções retrovirais, principalmente para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O HIV é um vírus que ataca principalmente os linfócitos T CD4<sup>+</sup> responsáveis por coordenar a defesa imunológica do organismo contra vírus, bactérias e fungos. O tratamento antirretroviral contra o HIV não cura ou mata o vírus, mas retarda sua multiplicação (DEEKS et al., 2013).

De acordo com a De Clercq (2009), atualmente existem seis categorias de antirretrovirais que agem de acordo com o alvo de interação no ciclo replicativo do HIV (Tabela 4):

Tabela 4 – Categorias do antirretrovirais e seus compostos

<b>Categorias</b>	<b>Compostos</b>
<b>Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos</b>	Zidovudina, didanosina, abacavir, lamivudina, estavudina, zalcitabina e emtricitabina
<b>Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos</b>	Nevirapina, delavirdina, efavirenz e etravirina
<b>Inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleotídeos</b>	Tenofovir
<b>Inibidores da protease</b>	Saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir e darunavir
<b>Inibidores de fusão/de entrada</b>	Enfuvirtida
<b>Inibidores da integrase</b>	Raltegravir

Fonte: adaptado de DE CLERCQ (2009).

De acordo com NCUBE et al. (2018), o impacto de um tratamento ARV contra o HIV pode ser categorizado em quatro objetivos: virológico em que o alvo é reduzir a carga viral; a finalidade imunológica em que o alvo é melhorar o sistema imunológico; a finalidade terapêutica onde o propósito é reduzir os efeitos colaterais, sintomas e infecções oportunistas e o objetivo epidemiológico cujo propósito é prevenir a transmissão do HIV de uma pessoa para outra. A incapacidade dos ARVs de erradicar completamente o HIV do corpo implica que um reservatório inativo de linfócitos T persiste no corpo de uma pessoa infectada, obrigando os soropositivos a tomarem medicamentos para o resto de suas vidas visando suprimir a multiplicação viral.

Assim como qualquer outro fármaco, os ARVs podem ser vistos como poluentes pseudo-persistentes no ambiente devido à sua liberação contínua (DAOUK et al., 2015). Como se descobriu que traços de antibióticos na água induzem resistência antibacteriana, a ameaça da resistência antirretroviral devido aos ARVs e seus metabólitos, existe a necessidade de investigação melhor estes compostos



(SAUVÉ e DESROSIERS, 2014). Uma séria preocupação relacionada à presença destes na água potável e em fontes de alimentos é a potencial criação de cepas resistentes do HIV no corpo através da exposição da água contaminada. Os antirretrovirais são diferentes dos outros fármacos, pois o seu efeito terapêutico funciona contra um vírus que se transforma facilmente em estirpes resistentes, se a medicação não for tomada de acordo com a prescrição. Isso implica que qualquer traço de ARVs em fontes de alimentos e água potável têm mais efeitos adversos para a saúde humana do que outras classes de produtos farmacêuticos (NCUBE et al., 2018).

Um dos estudos pioneiros a respeito dos ARVs em matrizes ambientais foi realizado por Prasse et al. (2010), o principal objetivo da pesquisa foi o desenvolvimento e validação de um método sensível para a análise simultânea de nove antivirais (aciclovir, abacavir, lamivudina, nevirapina oseltamivir, penciclovir, ribavirina, estavudina, zidovudina) e um metabólito ativo (carboxilato de oseltamivir) em águas residuais brutas e tratadas, bem como em águas superficiais da Alemanha.

Na África do Sul, Schoeman et al. (2015) identificaram a presença de nevirapina e efavirenz em duas ETARs na província de Gauteng, estes fármacos foram quantificados por meio de GC-TOF/MS. Wood et al. (2015) relataram a presença de uma lista mais abrangente de 12 ARVs em águas superficiais próximas a ETARs na África do Sul. Um estudo de Swanepoel et al. (2015) detectou ARVs em águas subterrâneas, bem como amostras de água da torneira da Província de Gauteng, África do Sul, e antirretrovirais em águas subterrâneas foram relatados por K'oreje et al. (2016) no Quênia.

Em vista das literaturas mencionadas acima, existe uma lacuna na compreensão total da presença de ARVs em vários compartimentos ambientais e é extremamente necessária uma compreensão do destino ambiental e do efeito ecotoxicológico destes compostos. A lista de ARVs que foram detectados em amostras ambientais está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Compilação das ocorrências e concentrações dos antivirais em diferentes matrizes ambientais

<b>Substância</b>	<b>Concentração (ng L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>	<b>Matrizes</b>	<b>Local</b>	<b>Referência</b>
<b>Aciclovir</b>	1780	Afluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	53,3	Efluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	31	Água superficial	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	154 mg.L <sup>-1</sup>	Efluente farmacêutica	Itália	MASCOLO et al., 2010
	1990	Afluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2011
	148	Efluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2011
	113	Água superficial	China	PENG et al., 2014
	2394	Lixiviado de aterro	China	PENG et al., 2014
	34	Água de reservatório	China	PENG et al., 2014
	406	Afluente de ETE	China	PENG et al., 2014
	205	Efluente de ETE	China	PENG et al., 2014
	705	Efluente primário	EUA	MCCURRY et al., 2014
	1410	Água superficial	EUA	BRADLEY et al., 2014
	1360	Efluente de ETE	EUA	BRADLEY et al., 2014
	599	Efluente hospitalar	Japão	AZUMA et al., 2016
	2302	Afluente de ETE	Japão	AZUMA et al., 2016
	50	Efluente de ETE	Japão	AZUMA et al., 2016
	23	Água superficial	Japão	AZUMA et al., 2016
	8050	Água subterrânea	Alemanha	FUNKE et al., 2016
	740	Afluente de ETE	Alemanha	FUNKE et al., 2016

<b>Efavirenz</b>	17400	Afluente de ETE	África do Sul	SCHOEMAN et al., 2015
	7100	Efluente de ETE	África do Sul	SCHOEMAN et al., 2015
	34000	Afluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	34000	Efluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	148	Água superficial	África do Sul	WOODING et al., 2017
	2450	Água superficial	África do Sul	MTOLO et al., 2019
	37,3	Efluente de ETE	África do Sul	MLUNGUZA et al., 2020
	45000	Água superficial	África do Sul	HORN et al., 2022
	577,9	Água superficial	África do Sul	MHUKA et al., 2020
	2169	Afluente de ETE	África do Sul	MHUKA et al., 2020

<b>Lamivudina</b>	5428	Água superficial	Quênia	NGUMBA et al., 2016a
	3985	Efluente de ETE	Quênia	NGUMBA et al., 2016a
	167100	Água superficial	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	60680	Afluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	31070	Efluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	210	Afluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	< LQ	Efluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	242	Água superficial	África do Sul	WOOD et al., 2015
	55	Afluente de ETE	Finlândia	NGUMBA et al., 2016b
	22	Efluente de ETE	Finlândia	NGUMBA et al., 2016b
	11,5	Água superficial	Finlândia	NGUMBA et al., 2016b
	96	Efluente primário	EUA	MCCURRY et al., 2014
	2200	Afluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	130	Efluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	405000	Afluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2018
	100000	Efluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2018
	470	Afluente de ETE	Alemanha	FUNKE et al., 2016
	48	Efluente de ETE	Alemanha	FUNKE et al., 2016
	16,1	Água subterrânea	EUA	FISHER et al., 2016
	49700	Água superficial	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020
118970	Afluente de ETE	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020	
55760	Efluente de ETE	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020	
10,32	Água superficial	África do Sul	MHUKA et al., 2020	

---

226,2	Afluente de ETE	África do Sul	MHUKA et al., 2020
500	Água superficial	Quênia	KANDIE et al., 2020

---

	0,29	Efluente de ETE	África do Sul	SWANEPOEL et al., 2015
	7684	Água superficial	Quênia	NGUMBA et al., 2016a
	543	Efluente de ETE	Quênia	NGUMBA et al., 2016a
	17410	Água superficial	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	20130	Afluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	110	Efluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2016
	170	Água superficial	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	564	Efluente de ETE	Alemanha	PRASSE et al., 2010
	973	Água superficial	África do Sul	WOOD et al., 2015
	62	Afluente de ETE	Finlândia	NGUMBA et al., 2016b
	22 – 37	Efluente de ETE	Finlândia	NGUMBA et al., 2016b
<b>Zidovudina</b>	53000	Afluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	500	Efluente de ETE	África do Sul	ABAFE et al., 2018
	50000	Afluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2018
	1500	Efluente de ETE	Quênia	K'OREJE et al., 2018
	440	Afluente de ETE	Alemanha	FUNKE et al., 2016
	180	Efluente de ETE	Alemanha	FUNKE et al., 2016
	9670	Água superficial	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020
	66590	Afluente de ETE	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020
	37140	Efluente de ETE	Zâmbia	NGUMBA et al., 2020
	3700	Água superficial	África do Sul	HORN et al., 2022

a:Valores máximos reportados nos estudos

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que a detecção dos antirretrovirais em efluentes e nas demais matrizes ambientais é recente. Além disso, é possível observar que as concentrações dos ARVs nos efluentes e águas superficiais no continente africano são mais altos do que em qualquer outro lugar. Isso pode estar relacionado à alta prevalência da epidemia de HIV/AIDS que paira sobre o continente aliado a falta de sistemas adequados de saneamento o que poderia levar ao aumento da concentração de ARVs nas águas superficiais africanas (NGUMBA et al., 2020; HORN et al., 2022).

O aciclovir, dentre os antivirais estudados apresenta uma grande quantidade de dados sobre sua ocorrência no meio aquático. Esse fato talvez se explique devido ao tempo de existência do fármaco, uma vez que foi um dos primeiros antivirais a ser comercializado.

A concentração de aciclovir proveniente de efluentes de indústria farmacêutica foi de  $154 \text{ mg L}^{-1}$  (MASCOLO et al., 2010), considerada bastante alta, podendo causar danos aos seres humanos e em organismos aquáticos (SINGER et al., 2011). No afluente de uma ETE, a maior concentração de aciclovir relatada foi de  $17800 \text{ ng L}^{-1}$  e uma menor concentração ( $31 \text{ ng L}^{-1}$ ) também foi encontrada na água de um rio alemão (PRASSE et al., 2010).

Na China, o aciclovir foi detectado em uma ampla gama de matrizes como no Rio Pearl e seus afluentes, lixiviado de aterro, água de reservatório e efluentes brutos e tratados em concentrações variando de  $34$  a  $2394 \text{ ng L}^{-1}$  (PENG et al., 2014), a detecção do fármaco em água de reservatório é preocupante pois, a ingestão de quantidades traços de ACV pode causar dores de cabeça, diarreia, problemas estomacais e até insuficiência renal (PORTILLA et al., 2007). Portanto, é necessário investigar os resíduos e o comportamento do ACV em ambientes aquáticos.

Na África do Sul, K'oreje et al. (2016a) encontraram a concentração de  $167000 \text{ ng L}^{-1}$  de lamivudina em amostras de água superficial, como evidenciado na Tabela 5. O destino ambiental dos ARVs diários deve ser motivo de preocupação para evitar a exposição involuntária da população mundial aos ARVs através de água potável, especialmente em regiões como a África Subsaariana, onde há uma concentração alta de indivíduos soropositivos (NCUBE et al., 2018).

De acordo com o único estudo sobre medicamentos antivirais na Finlândia publicados por Ngumba et al. (2016b), AZT teve a maior concentração quantificada

entre outros fármacos, tanto no afluente quanto no efluente, embora tenha sido concentrações muito menores do que o relatado em outros países. Embora a taxa de HIV na Finlândia seja baixa, a presença de AZT e mais outro antirretroviral, nomeadamente nevirapina (NVP), sugere que seja uma combinação de primeira linha que a maioria dos pacientes toma diariamente (NGUMBA et al., 2016a, 2016b).

A zidovudina (AZT) é predominantemente metabolizado em seu glicuronídeo, onde é encontrado na urina humana, juntamente com o composto original. Mosekiemang et al. (2019) estudaram o composto original em ETARs na África do Sul, mas não foi detectado. A zidovudina também foi detectada em várias centenas de  $\text{ng L}^{-1}$  em águas residuais alemãs. A concentração elevada foi atribuída à clivagem de conjugados de glicuronídeo, que são excretados por humanos (70%), como relatado por Prasse et al. (2010). K'oreje et al. (2016) concluíram que o AZT não é apenas um dos compostos mais frequentemente detectados entre os compostos estudados, mas também encontrado nas concentrações mais altas (escala  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

A lamivudina é um esquema antirretroviral de primeira linha. O fármaco foi detectado em concentrações de até  $60680 \text{ ng L}^{-1}$  no afluente no Quênia, exibindo baixas remoções (24-59%) (FUNKE et al., 2016). Outro estudo no Quênia desenvolvido por Ngumba et al. (2016a) revelou concentrações de  $5428$  e  $395 \text{ ng L}^{-1}$  nas águas superficiais e afluente, respectivamente. Os mesmos autores conduziram outro estudo com ARVs, incluindo lamivudina na Finlândia e obtiveram concentrações de  $55 \text{ ng L}^{-1}$  em afluentes e  $22 \text{ ng L}^{-1}$  em efluentes (NGUMBA et al., 2016b). Prasse et al. detectaram 3TC em águas residuais alemãs em uma concentração de até  $720 \text{ ng L}^{-1}$ .

Os dados das concentrações dos antivirais apresentados na Tabela 5 mostram a urgente necessidade em se investigar os impactos na biota decorrentes da exposição a esses fármacos.



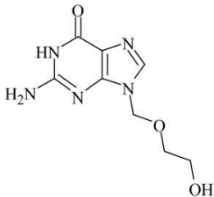
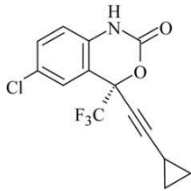
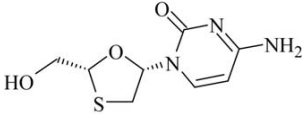
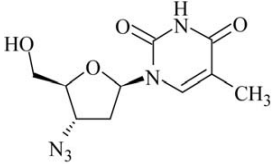
#### **2.4. Propriedades físico-químicas e mecanismos de ação dos antivirais**

O conhecimento das propriedades físico-químicas de fármacos é importante para se entender a absorção, metabolismo e excreção dos fármacos no corpo humano e também a prever o destino ambiental, a toxicidade humana ou a ecotoxicidade (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2014). A absorção ocorre por difusão simples com a maioria dos fármacos (GALBRAITH et al., 2004). No entanto, a absorção é afetada por algumas características físico-químicas dos medicamentos, como tamanho e forma molecular, grau de ionização e lipofilicidade (BUXTON e BENET, 2011).

No meio ambiente, as propriedades físico-químicas como solubilidade aquosa, coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ), o tamanho da molécula, o estado de ionização são fatores que influenciam a dinâmica dos compostos químicos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2014). As características físico-químicas dos antivirais (solubilidade em água, peso molecular, estrutura química, volatilidade e polaridade) variam amplamente; portanto, existe a possibilidade de que eles apresentem recalcitrância no tratamento de águas residuais (JAIN et al., 2013; SCHOEMAN et al., 2017).

A Tabela 6 apresenta as estruturas químicas e as principais propriedades físico-químicas dos antivirais abordados neste estudo.

Tabela 6 – Estrutura molecular e propriedades físico-químicas dos antivirais

Fármacos	Fórmula estrutural	pKa <sup>a</sup>	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	Solubilidade em água (mg.mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
Aciclovir C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Massa molar: 225,20		3,02 e 11,98	-1	9,08
Efavirenz C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> Massa molar: 315,67		-1,5 e 12,52	4,46	0,00855
Lamivudina C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S Massa molar: 229,26		-0,16 e 14,29	-1,1	2,76
Zidovudina C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Massa molar: 267,2		-3 e 9,96	-0,3	16,3

<sup>a</sup> Dados do ChemAxon<sup>b</sup> Dados do VCCLAB

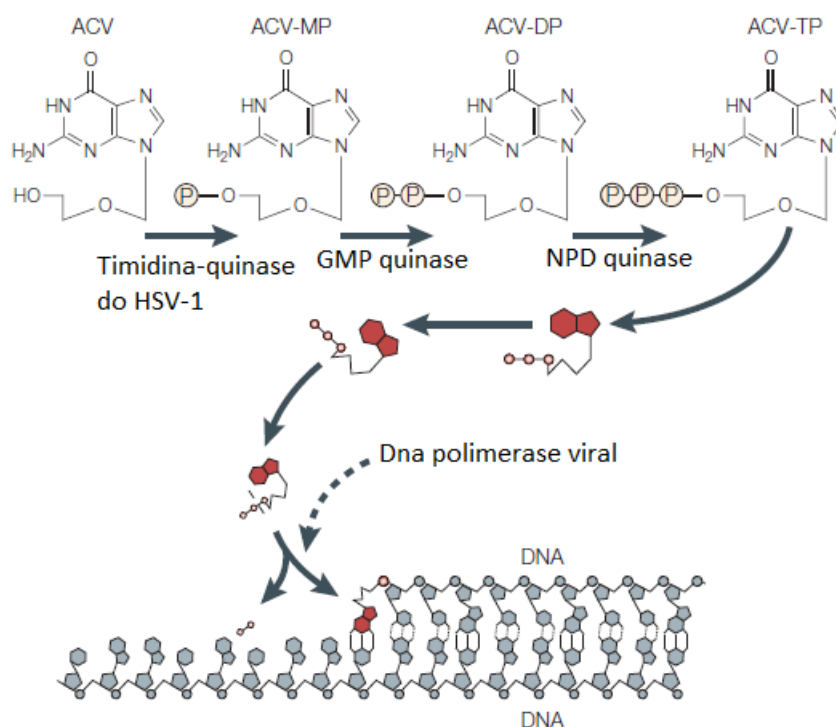
#### 2.4.1. Aciclovir

O aciclovir (ACV) é um dos medicamentos antivirais mais antigos e amplamente utilizados para tratar infecções causadas pela família herpesvírus, incluindo vírus *Herpes simplex* (VHS), tipos 1 e 2; vírus *Varicella zoster* (VVZ); vírus *Epstein Barr* (VEB) e Citomegalovírus (CMV), sendo também prescrito para pacientes com sistemas imunológicos enfraquecidos com a finalidade de controlar patologias como a conjuntivite viral (DE CLERCQ, 2002; BRYAN-MARRUGO et al., 2015).

A descarga ambiental do aciclovir levantou um alarme devido ao seu potencial de causar distúrbios no ecossistema. Sua liberação e contato subsequente com patógenos resulta na alteração da composição genética de agentes patogênicos e aumenta o risco de resistência viral (KÜMMERER, 2008).

A ativação do fármaco requer a presença de três quinases na célula para converter o aciclovir em um derivado trifosfatado. A Timidina Quinase viral (TK) converte o aciclovir em aciclovir monofosfato. Em seguida, a TK viral adiciona um fosfato ao grupo 5'-OH do aciclovir. O aciclovir monofosfato (ACV-MP) é um substrato para as enzimas celulares (GMP e NDP quinase que sintetizam o aciclovir trifosfato (ACV-TP). O composto trifosfatado é reconhecido pela DNA polimerase viral e incorporado ao DNA viral. A cadeia de DNA incompleta liga-se à DNA polimerase viral, causando a sua inibição irreversível (EVANS et al., 1998). As etapas mostrando o mecanismo de ação do aciclovir está evidenciado na Figura 3.

Figura 3 – Mecanismo de ação do fármaco aciclovir nas células infectadas pelo vírus da herpes.



Abreviações: ACV-MP/DP/TP: ACV-monofosfato/difosfato/trifosfato;

GMP: monofosfato de guanosina; NDP, nucleosídeo 5'-difosfato.

Fonte: adaptado de DE CLERQ, 2002.

Verificou-se que 45-75% do ACV é excretado por pacientes como composto inalterado na urina e fezes de seres humanos (GALASSO et al., 2002; WILBY et al., 2016). Prodrugas como valaciclovir, 2-amino-9-[2-hidroxietoxi-metil]-9H-purina (A515U) também se acumulam na forma de ACV no ambiente, portanto, aumentando sua concentração em águas residuais (TYRING et al., 2002). Em seres humanos, a toxicidade do fármaco gera insuficiência renal, náuseas, diarreia, dor de cabeça, tremores, delírio e encefalopatia (BRANDARIZ-NUÑEZ et al., 2021).

Técnicas utilizando tratamento biológico foram relatados para remover ACV de águas residuais, contudo os compostos identificados após a biodegradação foram relatados como sendo mais tóxicos ou persistentes no ambiente do que o composto original (PRASSE et al., 2011).

#### 2.4.2. Efavirenz

Efavirenz (EFV) é um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, tem sido amplamente utilizado para tratar cepas mutantes de HIV desde 1998 e é o terceiro antirretroviral mais utilizado por soropositivos mundialmente (BASTOS et al., 2016). É perigoso no meio ambiente, pois é persistente e tóxico para a vida aquática (STOCKHOLM COUNTY COUNCIL, 2014).

O EFV foi o primeiro agente antirretroviral aprovado pela FDA para ser tomado apenas uma vez ao dia. Esse fármaco apresenta alta eficiência e tolerabilidade a longo prazo, o que fez com que os esquemas antirretrovirais contendo EFV apresentem as respostas mais satisfatórias. No entanto, o fármaco não deve ser administrado como monoterapia, mas sim associado a esquemas com outros ARVs (BRUNTON e KNOLLMANN, 2018).

Os efeitos adversos do EFV incluem: erupções cutâneas, raros relatos de ocorrência da síndrome de Stevens-Johnson (erupções cutâneas fatais); efeitos tóxicos que envolvem o sistema nervoso central (SNC), como tontura, comprometimento da concentração, insônia, sonhos vívidos ou anormais, psicose franca (depressão, alucinação e/ou manias), cefaleia, aumento das transaminases hepáticas e níveis séricos elevados de colesterol. Além disso, o EFV é um ARV teratogênico em primatas, pois quando foi administrado a fêmeas grávidas de macacos, 25% dos fetos apresentaram malformações e em seis casos de mulheres grávidas que fizeram uso do fármaco, os fetos apresentaram malformações do cérebro e da medula espinhal (BRUNTON e KNOLLMANN, 2018).

#### 2.4.3. Lamivudina

Lamivudina (3TC) é usada no tratamento de infecção por HIV em combinação com outros agentes antirretrovirais (JOHNSON et al., 1999). A 3TC é utilizada também no tratamento de pacientes com infecção crônica por Hepatite B.

Para atuar, a 3TC também passa por reações intracelulares de fosforilação. A desoxicidina quinase é responsável pela formação da lamivudina monofosfato (3TC-P). A lamivudina difosfato (3TC-2P) é formada pela ação das enzimas citidina monofosfato quinase e desoxicidina monofosfato quinase. Finalmente, pela ação da

pirimidina nucleosídeo difosfato quinase, ocorre a formação da lamivudina trifosfato (3TC-3P) (MOORE et al., 1999). O anabólito ativo é o composto trifosforilado (3TC-3P), sendo que o difosfato é o anabólito predominante e limitante da formação da 3TC-3P (JOHNSON *et al.*, 1999).

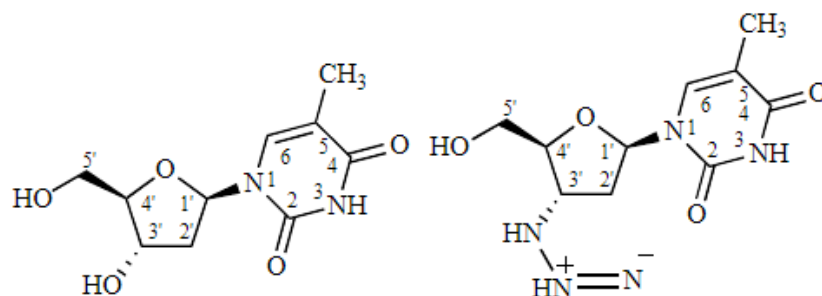
Abafe et al. (2018) relataram recentemente que a digestão anaeróbica convencional de águas residuais seguida de cloração levou a mais de 99% de remoção de lamivudina de efluentes na África do Sul.

#### 2.4.4. Zidovudina

Zidovudina (AZT) é um pró-fármaco, cuja forma ativa é a zidovudina trifosfato (AZT-3P). A AZT-3P é obtida por reações de fosforilação do fármaco nos linfócitos. Seu mecanismo de ação consiste em inibir competitivamente a incorporação, pela enzima transcriptase reversa, da timidina ao DNA viral (VEAL e BACK, 1995).

A transcriptase reversa do HIV é uma enzima codificada pelo vírus responsável pela conversão do RNA viral em DNA e por desempenhar um papel essencial no ciclo de vida do retrovírus, esta enzima é um importante alvo para antivirais (SARAFIANOS et al., 2009). Neste contexto, sendo o AZT um análogo da timidina (Figura 4), tem se mostrado útil no tratamento da infecção pelo HIV (KERR e ANDERSON, 1997).

Figura 4: Timidina (esquerda), AZT (direita).

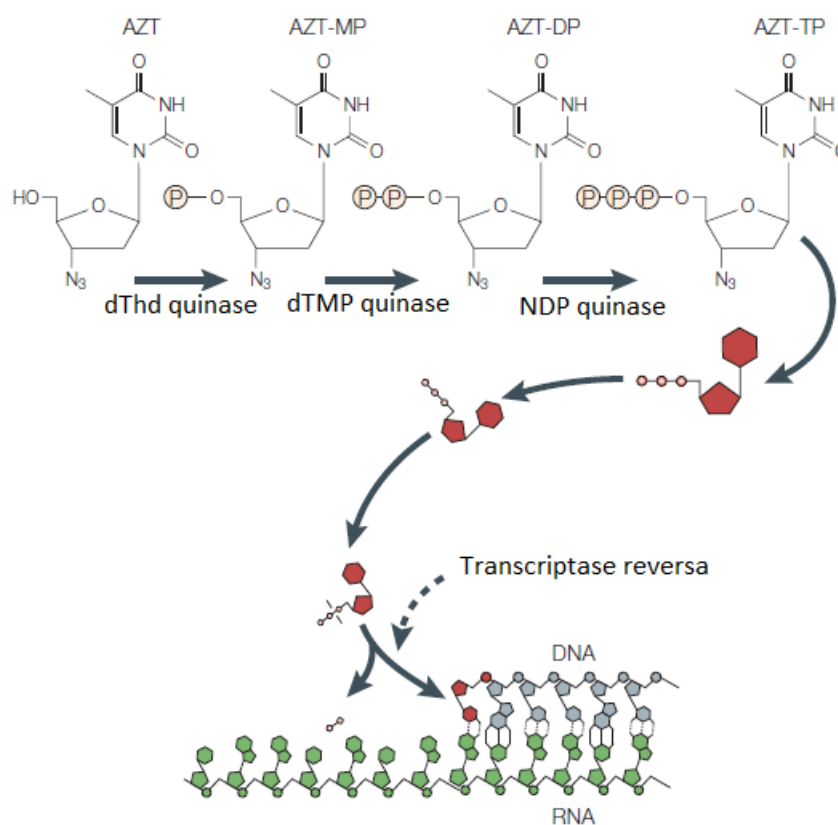


Fonte: D'ANDREA et al., 2008.

As enzimas celulares convertem o AZT ao seu trifosfato N3dTTP (3'-azido-3'-desoxitimidina-5'-trifosfato), um metabólito ativo que inibe a síntese de DNA por transcriptase reversa do HIV e polimerases de DNA celular (BAZIN et al., 1989).

Análises cinéticas demonstraram que a zidovudina trifosfato inibe a transcriptase reversa do HIV mais do que as polimerases do DNA celular (DE CLERCQ, 2002) (Figura 5).

Figura 5 – Mecanismo de ação do fármaco zidovudina nas células infectadas pelo HIV.



Abreviações: AZT-MP/DP/TP: AZT-monofosfato/difosfato/trifosfato;

dThd: deoxitimidina quinase;

dTMP: timidilato quinase;

NDP: Nucleosídeo Difosfato.

Fonte: DE CLERCQ, 2002

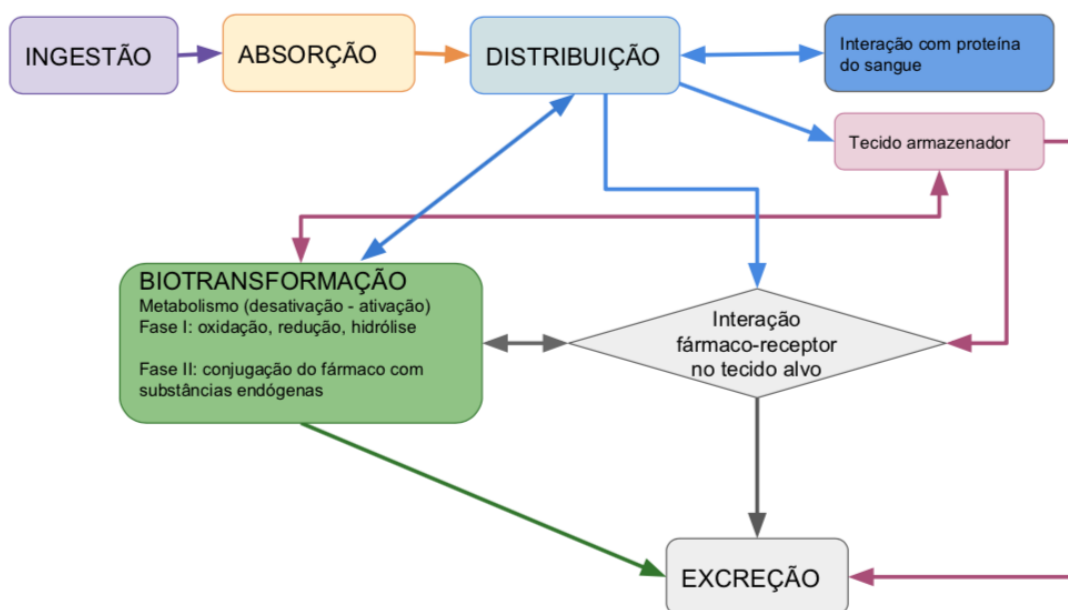
O AZT é indicado para o tratamento inicial de adultos infectados pelo HIV, apresentando contagem de células CD4<sup>+</sup> inferior a 500 células mL<sup>-1</sup>. Seu uso é indicado também para crianças com mais de três meses de idade e mulheres grávidas infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos (AOKI, 1999).

## 2.5. Farmacocinética dos antivirais

A farmacocinética visa entender a absorção, a distribuição, as biotransformações e a eliminação de fármacos no homem e nos animais. Absorção e distribuição indicam a passagem das moléculas do fármaco do local de administração para o sangue e a passagem das moléculas do fármaco do sangue para os tecidos, respectivamente. A eliminação de drogas pode ocorrer através de biotransformação e pela passagem de moléculas do sangue para o exterior do corpo através de urinas, bÍlis ou outras vias (Figura 6) (URSO et al., 2002).

Os valores de biodisponibilidade de diferentes ARV variam de 10 a 86% (Tabela 7), indicando que nenhum desses medicamentos é totalmente absorvido pelo organismo e uma grande parte é liberada diretamente no meio ambiente através de fezes e urina (NCUBE et al., 2018).

Figura 6 – Etapas da fase farmacocinética



Fonte: adaptado de MOURA e REYES (2002).

A Tabela 7 evidencia as principais propriedades farmacológicas e farmacocinéticas dos antivirais deste estudo.



Tabela 7 – Propriedades farmacológicas e farmacocinéticas dos antivirais

Fármaco	Mecanismo de ação	Farmacocinética	Considerações especiais
<b>ACV</b>	O ACV é fosforilado em seu composto ativo, o trifosfato de aciclovir, após penetrar nas células infectadas pelo herpes. A primeira etapa desse processo requer a presença da timidina quinase codificada pelo Vírus. O trifosfato de aciclovir age como inibidor e substrato para a DNA-polimerase específica do herpes, impedindo a síntese do DNA viral.	Absorção: Parcialmente absorvido no intestino. Distribuição: Ligado a proteínas 9% -33%. Metabolismo: Hepático, o aciclovir é metabolizado em 9 [(carboximetoxi) metil] guanina (CMMG) e 8 hidroxí-aciclovir (8-OH-ACV) por oxidação e hidroxilação. Eliminação: 45-75% é excretado por pacientes como composto inalterado. Biodisponibilidade: 10-20%.	Insuficiência renal, náuseas, diarreia, dor de cabeça, tremores, delírio e encefalopatia em seres humanos.
<b>EFV</b>	Liga-se à transcriptase reversa do HIV e bloqueia as atividades da DNA polimerase dependentes de RNA e dependentes de DNA.	Absorção: aumentada por gordura. Distribuição: > 99% ligada às proteínas (albumina). Metabolismo: metabolismo hepático via CYP3A4 e 2B6 aos metabólitos hidroxilados inativos. Eliminação: meia-vida de eliminação 40–55 h. Biodisponibilidade: 45%.	Não requer fosforilação intracelular. Pode induzir alterações no Sistema Nervoso Central e reações adversas dermatológicas comuns.

<b>3TC</b>	Análogo da citosina que é trifosforilado e inibe a reversão da transcriptase viral via terminação da cadeia de DNA viral e também inibe a DNA polimerase dependente de RNA e DNA.	<p>Absorção: rápida.</p> <p>Distribuição: Vd 1,3 L/kg, &lt;36% de proteína ligada.</p> <p>Metabolismo: 4,2% para o metabólito trans-sulfóxido.</p> <p>Eliminação: Meia-vida de eliminação: 5–7 h, excretados principalmente na urina como fármaco inalterado.</p> <p>Biodisponibilidade: 82-86%.</p>	Também indicado para o tratamento da hepatite B. Tontura, febre, náuseas, pancreatite, sensação de formigamentos nas pernas, dor nas articulações e músculos.
<b>AZT</b>	Análogo de timidina que interfere com a DNA polimerase dependente de RNA viral do HIV, inibindo a replicação viral.	<p>Absorção: rápida por difusão passiva</p> <p>Distribuição: Penetração significativa no líquido cefalorraquidiano (LCR), cruza a placenta, 25 a 38% de ligação às proteínas.</p> <p>Metabolismo: metabolizado hepaticamente via glucuronidação em metabolitos inativos.</p> <p>Eliminação: meia-vida de eliminação 0,5–3 h, 72–74% excretados na urina como metabolitos e 14–18% como droga inalterada.</p> <p>Biodisponibilidade: 65%.</p>	Toxicidade hematológica importante, incluindo granulocitopenia, anemia grave ou pancitopenia. Uso prolongado associado a miopatia e miosite.

Fonte: DRUGBANK; WILBY et al., 2016.

## 2.6. Ecotoxicologia

O termo “ecotoxicologia” foi usado pela primeira vez por Ernst Haeckel em 1866 no sentido de “economia da natureza” e “ciência de todas as interações entre os organismos e seu ambiente”. Nos anos seguintes a ciência da ecotoxicologia se desenvolveu como estudo, utilizando as ferramentas da toxicologia e dos poluentes químicos da biosfera sobre os organismos do meio ambiente (SANDERMANN, 2004; CRANE et al., 2008). Em 1969, René Truhaut definiu o termo “ecotoxicologia” como “o ramo da toxicologia voltado para o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre os constituintes dos ecossistemas, animais, vegetais e microbianos, em um contexto integral” (CRANE et al., 2008).

A ecotoxicologia é um campo multidisciplinar, integrando ecologia e toxicologia que visa o estudo dos efeitos potencialmente prejudiciais de substâncias químicas em organismos biológicos, desde o nível celular até o ecossistema. Métodos padronizados e harmonizados de testes ecotoxicológicos foram desenvolvidos dentro das estruturas da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE) e da International Organization for Standardization (ISO) para avaliar os efeitos de produtos químicos em organismos (RIST e HARTMANN, 2017).

A ecotoxicologia aquática tem como objetivo avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre os organismos pertencentes a ecossistemas aquáticos. Envolve o transporte, distribuição, a transformação e o destino final dos contaminantes no ambiente aquático. Estas etapas dependem principalmente das propriedades do ambiente e das características do contaminante (RAND et al., 1995).

Contaminantes em grandes locais contaminados muitas vezes compartilham propriedades críticas, como alta toxicidade aguda e/ou crônica, alta persistência ambiental, muitas vezes alta mobilidade levando à contaminação das águas subterrâneas e alta lipofilicidade levando à bioacumulação nas teias alimentares (FENT, 2003).

As concentrações de fármacos no meio ambiente são relativamente baixas em comparação com outros poluentes, o que levou à crença de que esses compostos não causariam impacto ambiental em organismos vivos (BREZOVSEK et al., 2014). No entanto, com base em suas funções terapêuticas e mecanismos de ação, alguns grupos de fármacos podem representar um risco para organismos não-alvo, mesmo

em concentrações de alguns nanogramas por litro e, especialmente, sob condições de exposição crônica (FENT et al., 2006).

Ensaio de toxicidade são experimentos biológicos com diferentes espécies na presença de substâncias químicas ou amostras ambientais. Eles são requeridos para avaliação de risco de produtos químicos novos ou preexistentes, assim como para o monitoramento da qualidade ambiental (água, solo, sedimento) (RATTE et al., 2003).

## **2.7. Ensaio de toxicidade**

### **2.7.1. Ensaio de toxicidade crônica**

Ensaio de toxicidade crônica são projetados para medir os efeitos de substâncias tóxicas para espécies aquáticas durante uma parte significativa do ciclo de vida do organismo. Estudos crônicos avaliam os efeitos subletais de compostos na reprodução, crescimento e comportamento devido a rupturas fisiológicas e bioquímicas (ADAMS e ROWLAND, 2002; LEBLANC, 2004).

As medidas comumente utilizadas de toxicidade crônica são: Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO). O CENO representa a maior concentração nominal do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste. O CEO representa a menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, nas condições de teste (ABNT, 2017).

Exemplos de estudos de toxicidade crônica em meio aquático incluem: daphnias (*Daphnia magna*), *Ceriodaphnia dubia*, oligoquetas (*Lumbriculus variegatus*), mosquitos (*Chironomus tentans*), anfípodo de água doce (*Hyalella azteca*), entre outros. Os ensaios com microalgas são tipicamente ensaios de curta duração, variando de 3 a 4 dias, o que poderia ser considerado um ensaio agudo, porém, como as espécies de algas se reproduzem rápido o suficiente, várias gerações são expostas durante o ensaio, sendo este teste considerado como crônico (ADAMS e ROWLAND, 2002).

### 2.7.2. Embriotoxicidade com *Daphnia similis*

Os cladóceros de água doce do gênero *Daphnia* são organismos frequentemente utilizados como modelos para bioensaios, são usados para investigar a toxicidade de substâncias químicas em ecossistemas aquáticos devido à sua alta sensibilidade, tempo de geração curto e a facilidade de manipulação em laboratório (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; TOUMI et al., 2015). Além disso, a reprodução é por partenogênese gerando uma prole de organismos geneticamente idênticos (OHTA et al., 1998; TOUMI et al., 2013).

*Daphnia*, um invertebrado de água doce da ordem Cladocera, desempenha um papel crítico nas redes alimentares ecológicas, entre produtores primários e peixes, e suas mudanças de vida afetam os ecossistemas aquáticos (BANG et al., 2015). Esses organismos são sexualmente partenogênicos e sua reprodução clonal oferece uma vantagem suprema para a uniformidade genética (TOUMI et al., 2015; NAGATO et al., 2016).

Em ensaio de toxicidade aguda e crônica usando daphnias, neonatos com menos de 24 horas são geralmente usados. Embora seja possível obter informações sobre efeitos tóxicos letais e subletais, o design desses ensaios não podem fornecer informações sobre os efeitos de sobrevivência do embrião e anormalidades morfológicas durante o desenvolvimento embrionário (DJEKOUN et al., 2015).

O ciclo de vida destes microcrustáceos incluem os estágios embrionário, neonatal, juvenil e adulto. Os estágios embrionário e neonatal são particularmente importantes em estudos de toxicidade (ABE et al., 2001; WANG et al., 2011). Vários estudos relataram que os embriões *Daphnia* são mais sensíveis a vários contaminantes do que os neonatos com *Daphnia* (WANG et al., 2011; TON et al., 2012; DJEKOUN et al., 2015).

Até o momento, poucas investigações foram realizadas para determinar os efeitos dos poluentes ambientais nos estágios de desenvolvimento de *Daphnia*.

## 2.8. Organismos-teste

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos é necessário a seleção de organismos-teste. Estes são selecionados de acordo com alguns critérios, tais como

sua abundância no ambiente, facilidade de cultivo no laboratório e conhecimento da biologia da espécie (RAND et al., 1995).

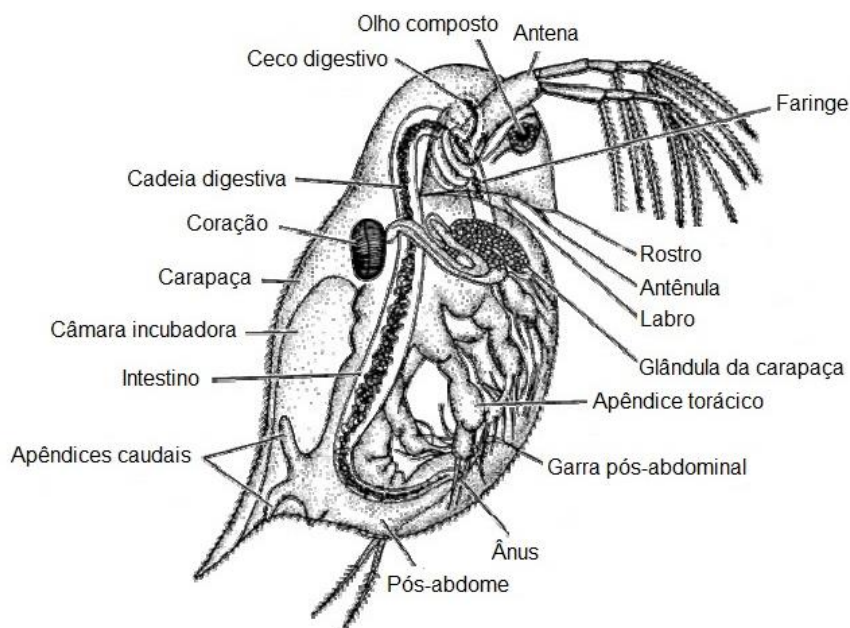
### 2.8.1. *Daphnia similis*

*Daphnia magna* e *Daphnia similis* são cladóceros de água doce comumente empregadas em bioensaios. Anatomia e morfologia são mostradas na Figura 7. O gênero *Daphnia* comumente conhecido como pulga d'água inclui mais de 100 espécies de água doce, vivem principalmente em reservatórios filtrando e se alimentando de bactérias, algas, cianobactérias, protozoários e outras pequenas partículas suspensas na água. O gênero desempenha um papel fundamental como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, além disso, por consumirem algas melhoram a qualidade da água (TATARAZAKO e ODA 2007; DIETRICH et al., 2010).

A aplicação de *Daphnia* sp. em estudos toxicológicos começou em 1944, quando Anderson usou esses crustáceos para avaliar a toxicidade de substâncias encontradas nas águas residuais industriais (ANDERSON, 1944). Atualmente, realizar bioensaios é uma das abordagens comumente utilizadas na avaliação de toxicidade de diferentes compostos químicos, incluindo produtos farmacêuticos (VILLEGAS-NAVARRO et al., 2003). Além disso, análises detalhadas de *Daphnia* permitem distinguir parâmetros de comportamento de natação, como velocidade de natação, distância percorrida e atividades fisiológicas, como frequência cardíaca, taxa de alimentação, taxa de ingestão e atividade do membro torácico (BOWNIK, 2019). Esses end-points permitem determinar os efeitos tóxicos mesmo em níveis subletais, o que é valioso na pesquisa ecotoxicológica.

*Daphnia* sp. é um organismo modelo que tem muitas vantagens práticas, incluindo: simplicidade de sua cultura em condições de laboratório, ciclo de vida curto, fácil manuseio e baixo custo de manutenção (BOWNIK, 2019)

Figura 7 – Anatomia e morfologia do cladócer, *Daphnia*.

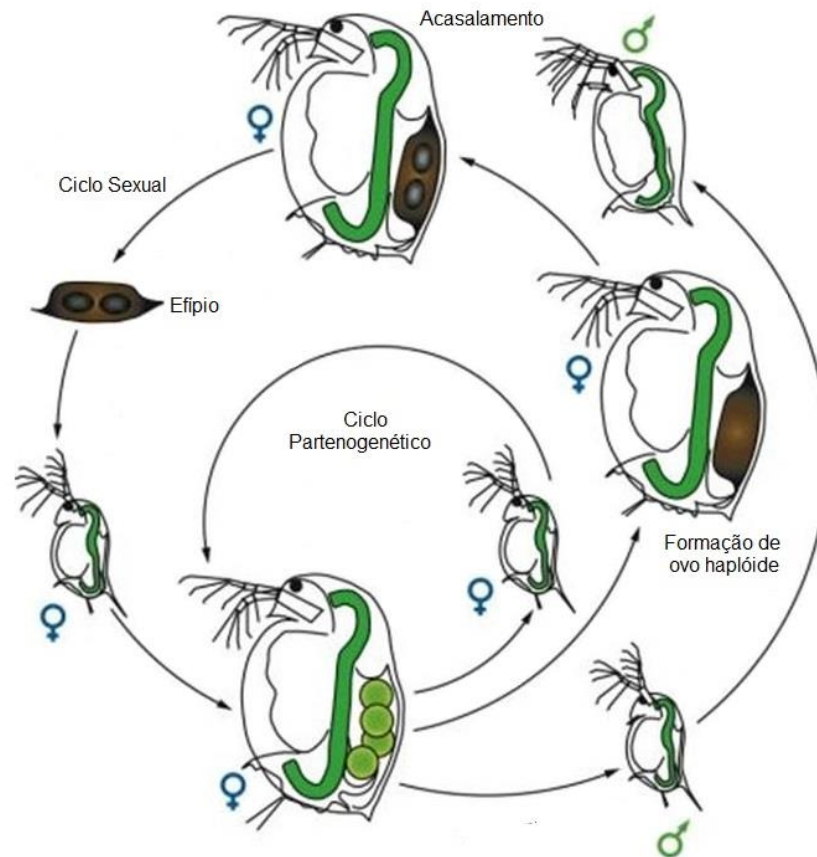


Fonte: Adaptado de EBERT (2005).

A Figura 8 mostra o ciclo de vida sexual e assexual (partenogenético) de uma *Daphnia similis*. Durante o ciclo partenogenético, as fêmeas produzem ovos diplóides que se desenvolvem diretamente em filhas. A mesma fêmea pode produzir ovos assexuados diplóides que se desenvolvem em filhos. A geração de machos está sob influência do ambiente, como superpopulação, alteração na temperatura da água ou escassez de alimento. Além disso, a mesma fêmea pode produzir ovos haplóides que requerem fertilização por machos. Esta fecundação gera ovos rígidos e resistentes, possuindo uma coloração escura, chamados de efípio (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; EBERT, 2005).

O seu ciclo de vida varia entre cerca de 40 dias a 25°C e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie entra na fase de maturação com 6 dias de vida e necessita de 6 a 10 dias para dar origem à primeira ninhada, tem, normalmente, neonatos de 2 em 2 dias. Os neonatos são liberados quando acontece a muda das carapaças (PEPPER et al., 1996).

Figura 8 - Ciclo de vida de *Daphnia similis*.



Fonte: Adaptado de EBERT (2005).

### 2.8.2. *Ceriodaphnia dubia*

*Ceriodaphnia dubia* (Figura 9) é um microcrustáceo de regiões temperadas, medindo de 0,8 a 0,9 mm de comprimento e possui um ciclo de vida muito semelhante à *Daphnia*. Ensaio com essa espécie têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade crônica, principalmente pelo menor tempo de exposição (7-8 dias) em comparação com *Daphnia* que dura 21 dias (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008; ABNT, 2018).



Figura 9 – Cladócero, *Ceriodaphnia dubia*



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2019

Como em todo cladóceros, o ciclo de vida da *Daphnia similis* e da *Ceriodaphnia dubia* consiste em fases alternadas de partenogênese. Neste tipo de reprodução, a população é composta apenas por fêmeas. O desenvolvimento direto, ou seja, aquele em que os indivíduos jovens são semelhantes aos adultos, ocorre em uma câmara incubadora dorsal. Quando o jovem deixa a câmara, a fêmea sofre ecdise, ou troca de carapaça, e uma nova desova é liberada na nova câmara incubadora (RUPPERT et al., 2005).

Em condições desfavoráveis de nutrientes, luz, temperatura há interferência na reprodução desses microcrustáceos, esses organismos adotam estratégias de sobrevivência, favorecendo o aparecimento de machos e conseqüentemente de efípios (espessamento de coloração escura contendo ovos de resistência). Quando mais de um efípio surgir em um lote do cultivo, os organismos jovens produzidos neste lote não devem ser utilizados no ensaio e o procedimento do cultivo deve ser reavaliado imediatamente (ABNT, 2018).

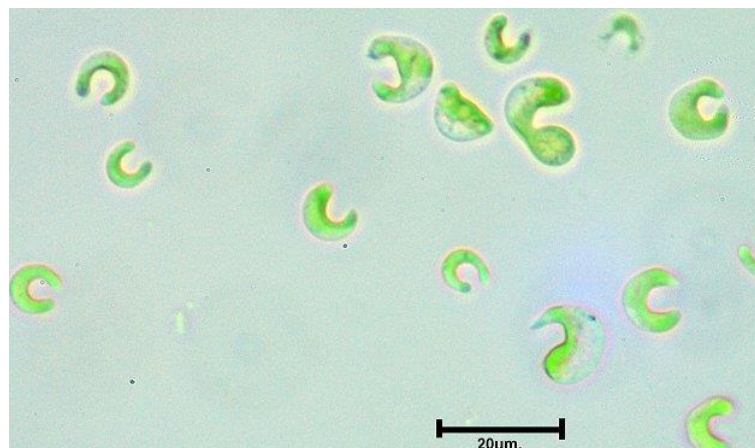
### 2.8.3. *Raphidocelis subcapitata*

Como produtoras primárias, as microalgas planctônicas representam um componente essencial nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos. Muitas espécies servem diretamente como fonte de alimento para organismos zooplanctônicos, que são posteriormente consumidos por outros invertebrados, peixes ou pássaros. Mudanças na estrutura e produtividade da comunidade de algas podem induzir mudanças estruturais diretas no resto do ecossistema e/ou afetar indiretamente o ecossistema, afetando a qualidade da água (ZHU et al., 2021).

Microalgas do filo Chlorophyta (algas verdes) são importantes componentes do fitoplâncton, possuem papel fundamental na disponibilidade de oxigênio molecular na Terra em função da fotossíntese. As algas verdes contêm pigmentos de clorofilas *a* e *b*, xantofilas e carotenos, sendo o amido a principal forma de reserva (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

A espécie *Raphidocelis subcapitata* (Figura 10), é unicelular e apresenta distribuição cosmopolita em corpos de água doce (OHSE, 2007; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Esta microalga é amplamente recomendada como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos devido ao curto tempo de geração e facilidade de cultivo e fornecer uma avaliação rápida de respostas aos poluentes, sendo intensamente utilizadas em ecotoxicológica aquática, devido à sua sensibilidade a impactos ambientais em ecossistemas aquáticos (OECD, 2002; ABNT, 2017).

Figura 10 - Microalga *Raphidocelis subcapitata*



Fonte: ALGALWEB (2019)

## 2.9. Análise de risco ambiental

A ocorrência de PFCs no ambiente é preocupante considerando o fato de que não estão isoladamente, mas em misturas que podem levar a efeitos aditivos ou sinérgicos indesejáveis (KOSMA et al., 2014; PETRIE et al., 2016). Embora seja uma prática comum avaliar o risco ambiental de compostos individualmente baseado nas diretrizes da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2006), esta abordagem pode super ou subestimar o real impacto ambiental das misturas (GODOY et al., 2015). Isso ocorre porque esta prática ignora o fato de que a ecotoxicidade de uma mistura de PFC é geralmente maior do que os efeitos de cada componente individual e que efeitos adversos consideráveis podem ocorrer mesmo se todos os componentes de tal mistura estiverem presentes abaixo de sua concentração de efeito individual não observado (CENO) (BACKHAUS e KARLSSON, 2014). Além disso, os efeitos de toxicidade da mistura podem ocorrer em organismos não-alvos que não podem ser previstos a partir dos efeitos individuais apresentados por seus componentes (BREZOVSEK et al., 2014; GODOY et al., 2015).

Pouco se sabe sobre os potenciais efeitos adversos da exposição a longo prazo a misturas complexas em baixas concentrações (HERNÁNDEZ e TSATSAKIS, 2017). Nesse contexto, os efeitos adversos causados pelas misturas de PFCs sobre organismos não-alvos representam uma crescente preocupação (MARTIN et al., 2021). Um dos principais desafios na avaliação toxicológica de misturas é a necessidade de abordar as lacunas de dados: dados sobre os efeitos de misturas, dose-resposta e mecanismo de ação são abordagens necessárias que falta para muitas classes químicas (BACKHAUS e KARLSSON 2014; BOPP et al. 2018).

A toxicidade da mistura ainda é um desafio muito complexo a ser integrado às estruturas regulatórias e é consenso que essa questão ainda é incipiente. Assim, compreender os mecanismos e interações envolvidas na ação conjunta desses compostos de preocupação ambiental é uma necessidade urgente. Nesse sentido, para que novos avanços possam ser alcançados neste campo, estudos futuros precisam estabelecer critérios consistentes para priorizar componentes de misturas planejando o tipo de ensaio mais adequado quanto à duração, ponto final e nível de organização biológica, escolher o desenho experimental ideal e as ferramentas adequadas para prever / avaliar os dados (GODOY et al., 2015)

Segundo Godoy e Kummrow (2017), estudos futuros devem se concentrar em priorizar os seguintes aspectos nas análises de toxicidade de misturas:

- Realizar mais estudos de mistura de PFCPs usando sistemas biológicos a fim de avaliar adequadamente os efeitos subletais;
- Evidenciar os efeitos crônicos da mistura de PFCP ao invés dos agudos, especialmente aqueles que visam avaliar a toxicidade multigeracional de longo prazo;
- Utilizar biomarcadores assim bem como, níveis mais elevados de organização biológica (por exemplo, micro e mesocosmos), a fim de vincular o conhecimento de vários níveis de organização biológica para uma análise de risco de mistura mais eficaz.

Em particular, mesmo se os compostos de uma mistura estão presentes apenas abaixo de seus respectivos limites de toxicidade, um efeito tóxico não pode ser excluído a priori (BACKHAUS et al., 2000). Estando ciente do fato de que as informações sobre a exposição de longo prazo e baixo nível de PFCPs são limitadas, a ameaça potencial ao ambiente aquático e aos humanos é provável (KONSTAS et al., 2019; KOSMA et al., 2020). O monitoramento dos fármacos é a ferramenta mais útil para obter informações sobre a variação da concentração de PFCPs, principalmente nos casos em que não há dados suficientes sobre o consumo dos mesmos (PAPAGEORGIU et al., 2016)

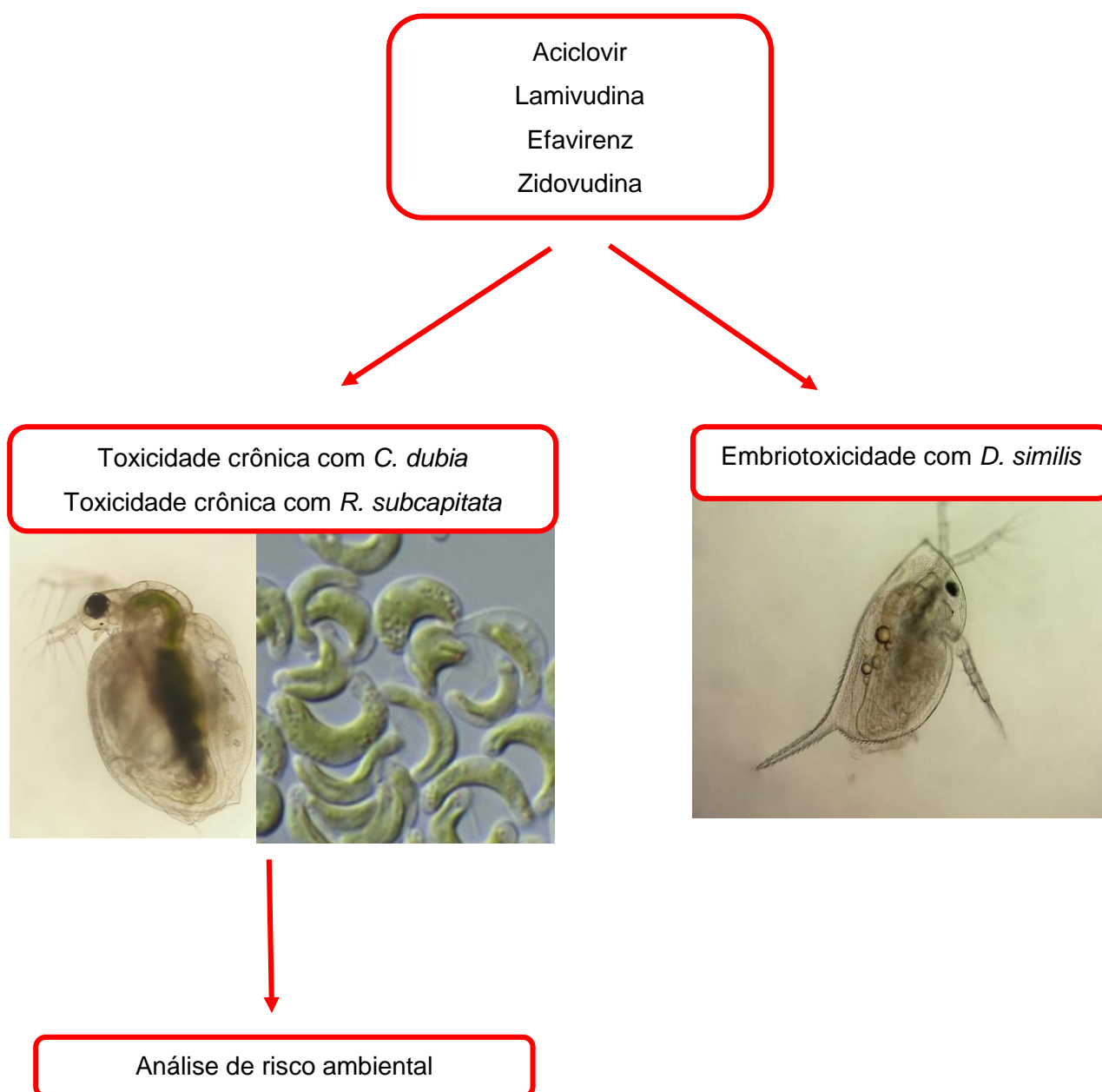
Uma das formas de avaliar o risco potencial de contaminantes emergentes é através do cálculo do quociente de risco ambiental (RQ) proposto pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2006).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios de toxicidade foram realizados no Laboratório de Engenharia Sanitária, do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A Figura 11 ilustra um esquema experimental para este estudo com base nos ensaios ecotoxicológicos.

Figura 11 – Esquema dos experimentos com base nos ensaios ecotoxicológicos.



### 3.1. Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados para o cultivo dos organismos e para as diluições encontram-se listados na Tabela 8. Os equipamentos utilizados encontram-se listados na Tabela 9. A água utilizada nos ensaios ecotoxicológicos foi água destilada. O aciclovir (ACV) e a lamivudina (3TC) foram obtidos da Sigma Aldrich com 94,9% e 99,6% de pureza, respectivamente. O efavirenz (EFV) e a zidovudina (AZT) foram adquiridos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ com 99,6% e 99,4% de pureza, respectivamente. A Tabela 10 apresenta as informações sobre os padrões analíticos utilizados neste estudo.

Tabela 8 - Especificação dos reagentes utilizados nos ensaios

<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
Sulfato de cálcio	VETEC
Cloreto de potássio	PROQUIMIOS
Bicarbonato de sódio	VETEC
Sulfato de magnésio	VETEC
Nitrato de cálcio	VETEC
Nitrato de potássio	SIGMA
Fosfato de potássio dibásico	VETEC
Sulfato de cobre pentahidratado	SIGMA
Sulfato de zinco heptahidratado	VETEC
Molibdato de amônio	VETEC
Cloreto de cobalto	VETEC
Nitrato de manganês	SIGMA
Ácido sórbico	PROQUIMIOS
Ácido bórico	VETEC
Citrato de ferro	VETEC
Cloreto férrico hexahidratado	VETEC
Sulfato ferroso heptahidratado	PROQUIMIOS

Tabela 9 - Especificação da instrumentação utilizada

<b>Equipamento</b>	<b>Especificação (marca)</b>
Vortex	Ika
Pipetas	Gilson
Medidor de pH	pH Digimed® DM-22, empregado com um eletrodo de vidro a $25 \pm 5^\circ\text{C}$
Sistema de purificação de água	Milli-Q, Direct 6.0
Balança analítica	Shimadzu (Tóquio, Japão) com precisão de 0,01mg
Centrífuga	Novatecnica – NT812
Mesa-agitadora orbital	Novatecnica
Incubadora com refrigeração	Novatecnica
Cabine se segurança biológica	Filter flux
Microscópio óptico	NIKON ECLIPSE E200
Pipeta automática 100-1000 $\mu\text{L}$	KASVI
Pipeta automática 10 $\mu\text{L}$	KASVI

Tabela 10 - Número CAS<sup>a</sup> dos compostos determinados, nome IUPAC<sup>b</sup>, marca e pureza

Compostos	Número CAS <sup>a</sup>	Marca	Pureza (%)	Nome IUPAC <sup>b</sup>
Aciclovir	59277-89-3	Sigma®	94,9	2-amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona
Efavirenz	154598-52-4	INCQS	99,6	(4S)-8-cloro-5-(2-ciclopropiletinil)-5-(trifluorometil)-4-oxa-2-azabicyclo [4.4.0] deca-7,9,11-trien-3-ona
Lamivudina	134678-17-4	Sigma®	99,6	4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-diidropirimidin-2-ona
Zidovudina	30516-87-1	INCQS	99,4	1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetraidropirimidina-2,4-diona

<sup>a</sup>CAS: *Chemical Abstracts Service*, <sup>b</sup>IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

### 3.2. Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas durante os experimentos e no preparo das amostras foram lavadas com detergente extran. Após essa lavagem inicial, as vidrarias ficaram submersas numa solução de ácido clorídrico 10 % (v/v) por 24 horas. Após esse tempo, o material foi retirado e enxaguado abundantemente com água corrente, seguida de álcool e água ultrapura, as vidrarias não volumétricas foram levadas à estufa de secagem a 200°C por 6 horas para remoção da matéria orgânica.



### 3.3. Cultivo e manutenção dos organismos-teste

#### 3.3.1. Cultivo de *Daphnia similis*

Os cultivos de *D. similis* foram mantidos no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES), pertencente ao Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Figura 12). A metodologia de cultivo do organismo-teste *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) seguiu o descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Os organismos são mantidos em béquer de vidro de 2000 mL em lotes contendo 30 organismos, fotoperíodo ajustado para 16 h de luz/8 horas de escuro, intensidade luminosa em torno de 1200 lux e temperatura regulada para 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Tais condições foram obtidas com a utilização de uma incubadora de fotoperíodo (modelo Q315F16, Quimis).

As *Daphnias* foram cultivadas em água reconstituída, com pH variando de 7,0 a 7,8 e a dureza ajustada para 40 a 48 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>. A água reconstituída, ou seja, que é utilizada tanto para o cultivo quanto diluição foi preparada a partir das soluções da Tabela 11.

Tabela 11 – Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição para *D. similis*.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1500	Dissolver e diluir para 1000 mL de água destilada
2	KCl	200	Dissolver e diluir para 1000 mL de água destilada
	NaHCO <sub>3</sub>	4800	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6100	

Fonte: NBR 12.713 (ABNT, 2016)

Para o preparo da água de cultivo e de diluição foram adicionados 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água destilada. Depois de preparada, a água foi aerada por 12 a 24 h, tempo suficiente para que o pH se estabilize, o oxigênio dissolvido atinja a saturação e para a solubilização total dos sais.

Figura 12 – Foto dos bécheres com cultivo de *Daphnia similis* em incubadora no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2019.

### 3.3.2. Cultivo de algas para alimentação de *D. similis*

O preparo do meio requer cuidado e assepsia, para tal, foi preparado no interior de uma capela de fluxo laminar, a qual foi descontaminada previamente utilizando-se álcool 70% e a incidência de luz ultravioleta por 15 minutos. Após a descontaminação, o meio L.C Oligo foi colocado em frasco Schott de 2 litros autoclavado, em seguida, foi mantido em agitação por uma hora para a solubilização dos reagentes. Após sua homogeneização, os frascos foram esterilizados em autoclave, permanecendo na mesma durante 15 minutos a partir do momento em que a pressão alcança o valor de 1 atm e temperatura de 121°C. Após a autoclavagem, transferiu-se uma alíquota de uma suspensão de microalgas para o novo meio de cultivo, os frascos Schott foram mantidos no interior de incubadora sob aeração e iluminação constantes e a temperatura 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

A Tabela 12 apresenta os reagentes utilizados para o preparo do meio de L.C. Oligo para a alga *R. subcapitata*.

Tabela 12 – Composição do meio L. C. Oligo para cultivo de *R. subcapitata*.

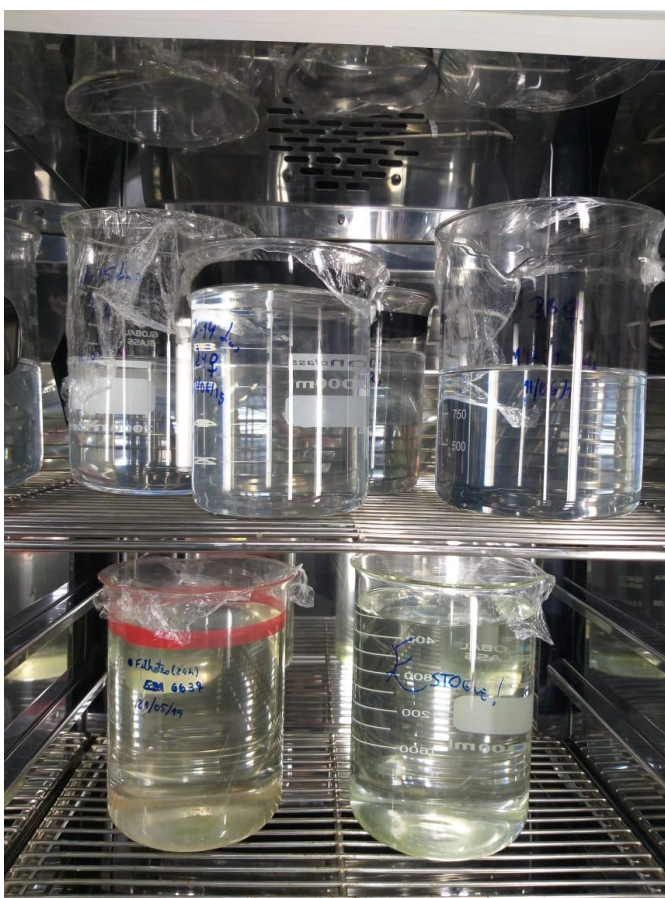
<b>Soluções</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Quant. de reagente (g)</b>	<b>Preparo</b>
<b>1</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,0	Dissolver e completar para 100 mL de água destilada
<b>2</b>	KNO <sub>3</sub>	10,0	Dissolver e completar para 100 mL de água destilada
<b>3</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,0	Dissolver e completar para 100 mL de água destilada
<b>4</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0	Dissolver e completar para 100 mL de água destilada
<b>5</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,03	Dissolver e completar para 1000 mL de água destilada
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,06	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,06	
	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06	
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,06	
<b>6</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06	Dissolver e completar para 1000 mL de água destilada
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,625	
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,625	
<b>7</b>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,625	Dissolver e completar para 1000 mL de água destilada
	NaHCO <sub>3</sub>	15	

Fonte: NBR 12648 (ABNT, 2016)

### 3.3.3. Cultivo de *Ceriodaphnia dubia*

O cladóceros *C. dubia* Richard, 1894 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) é mantido em cultivo no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Figura 13).

Figura 13 – Bécheres com cultivo do organismo-teste *Ceriodaphnia dubia* no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ.



Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2020

Culturas de *C. dubia* foram mantidas sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo com 16 h de luz:8 h de escuro e iluminação de 1200 lux. Os organismos foram mantidos em água reconstituída com pH 7,0 - 7,6 e dureza entre 40 - 48 mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , como recomendado pela NBR 13373 (ABNT, 2017). A troca total da água de cultivo foi realizada ao menos uma vez por semana, evitando diferenças de temperatura maiores que  $2^\circ\text{C}$ .

Estes microcrustáceos são alimentados diariamente com uma suspensão da alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* ( $10^5$  células mL<sup>-1</sup>), cultivada em meio L.C. Oligo conforme mostra a Tabela 11. Estas suspensões são semanalmente separadas dos frascos Shotts para tubos de menor volume para que o manejo seja facilitado.

#### 3.3.4. Cultivo de *Raphidocelis subcapitata*

*Raphidocelis subcapitata*, anteriormente conhecida como *Selenastrum capricornutum* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, é uma clorofícea de água doce, bastante recomendada para ensaios ecotoxicológicos devido a sua acelerada taxa de crescimento, ciclo de vida curto e grande sensibilidade a várias substâncias (ABNT, 2018).

Existe uma grande base de dados sobre a sensibilidade a vários produtos químicos e amostras ambientais complexas realizados com a alga *R. subcapitata*. Em comparação com os ensaios de toxicidade aguda e crônica com outras espécies aquáticas, como peixes e crustáceos, o teste de inibição do crescimento é frequentemente o mais utilizado (KÄLLQVIST et al., 2008).

Os cultivos são mantidos no Laboratório de Engenharia Sanitária da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, todas as etapas de metodologia de cultivo estão de acordo com a NBR 12948 (ABNT, 2018). As culturas de *R. subcapitata* são mantidas em meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), sob iluminação (2400 lux) e aeração contínua e temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), condições essas, controladas em uma incubadora (modelo 411/FPD da Novaética).

Para o seu cultivo, foram utilizados frascos Schott com capacidade de 2 L contendo 1,5 L de meio L.C. Oligo (Figura 14), previamente autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm por 15 minutos, a metodologia de preparo do meio encontra-se na Tabela 12.

Figura 14 – Bécheres com cultivo da microalga *Raphidocelis subcapitata* no Laboratório de Engenharia Sanitária da UERJ



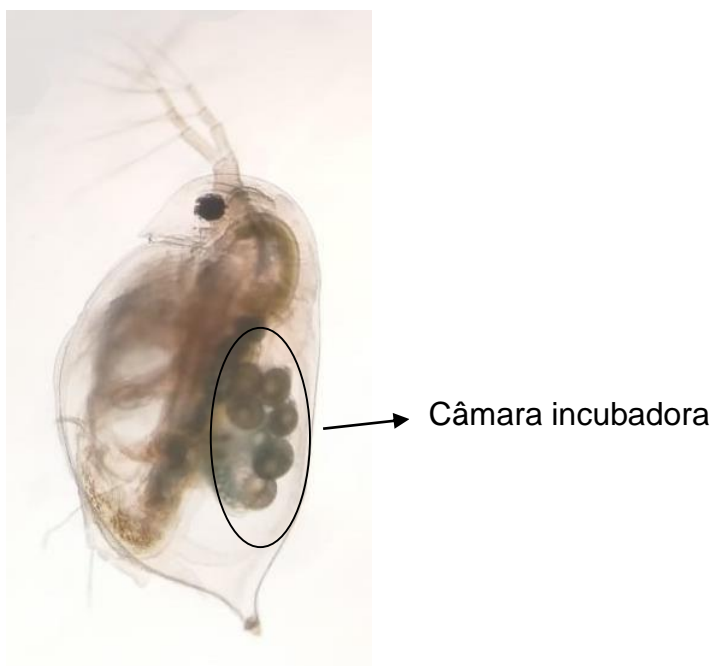
Fonte: PRÓPRIA AUTORA, 2020.

### 3.4. Ensaios ecotoxicológicos

#### 3.4.1. Ensaio de embriotoxicidade com *D. similis*

O ensaio de embriotoxicidade foi realizado seguindo o procedimento descrito por Djekoun et al. (2015). No entanto, algumas modificações foram empregadas visando alcançar as condições ótimas de realização do ensaio e a elaboração de um protocolo mais adequado para os contaminantes emergentes (ver ANEXO 1). Foram realizados ensaios para determinar se os antivirais induzissem diretamente malformações no embrião em desenvolvimento. Daphnias prenhes (7 a 10 dias de idade) foram selecionadas do cultivo e examinadas microscopicamente para avaliar o estágio de desenvolvimento dos embriões na câmara incubadora (Figura 15). Embriões que não exibiram nenhuma diferenciação celular (estágio 1 e 2) conforme as etapas de desenvolvimento de Kast-Hutcheson et al. (2001), foram removidos pressionando levemente a região posterior da câmara com uma pinça de dissecação. Embriões de *Daphnia* são perfeitamente capazes de terem um desenvolvimento normal fora do corpo da mãe e, portanto, adequados para estudos (CHEN et al., 2018)

Figura 15 – Embriões na câmara incubadora de Daphnia.



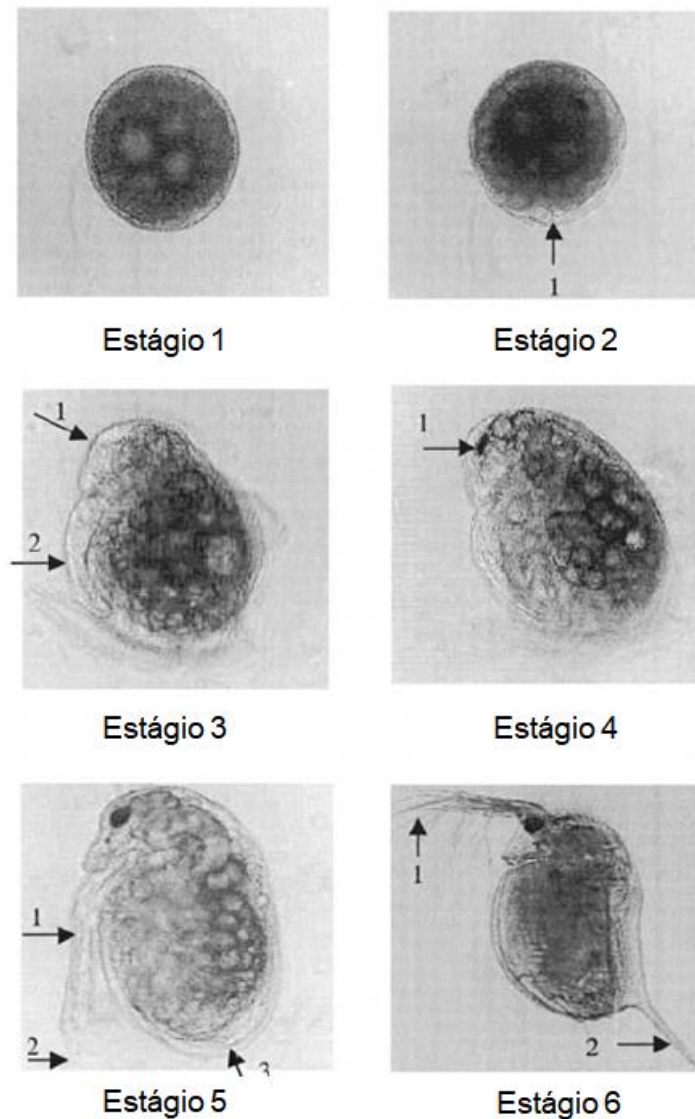
Fonte: PRÓPRIA AUTORA (2019)

Dez embriões foram individualmente e aleatoriamente inseridos em placas de Petri com 20 ml da solução-teste de antivirais nas seguintes concentrações de exposição:

- Aciclovir: 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>.
- Efavirenz: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µg L<sup>-1</sup>.
- Lamivudina: 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>.
- Zidovudina: 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>.

Dois ensaios em momentos diferentes realizados. O tratamento controle continha apenas meio de cultura. Os ensaios foram incubados a uma temperatura constante (20±2°C) com um fotoperíodo de 16 h de luz: 8 h de escuro. Os embriões foram submetidos a exame microscópico a cada 24 horas até o término de 96 horas para determinar as anormalidades morfológicas: anomalias na carapaça, antenas, espinha caudal, além de anotações do número de sobreviventes e mortos. Para a análise da embriotoxicidade, foram utilizados os seis estágios do desenvolvimento embrionário descritos por KAST-HUTCHESON et al., (2001) (Figura 16).

Figura 16 - Etapas do desenvolvimento embrionário normal de Daphnia.



Fonte: KAST-HUTCHESON et al., (2001).

### Estágios do Desenvolvimento Embrionário

- Estágio 1: **Clivagem**. O embrião é perfeitamente esférico, sem evidência de diferenciação celular. Duração: 0 a 15 h após a deposição na câmara de incubação.
- Estágio 2: **Gastrulação**. A organização e diferenciação celular são evidentes, e um blastóporo (1) pode ser discernido. A primeira membrana embrionária é lançada logo após a entrada no estágio 2 e o embrião torna-se assimétrico. Duração: 15 a 25 h após a deposição na câmara de incubação.



- Estágio 3. **Maturação embrionária precoce.** A cápsula da cabeça (1) e a segunda antena (2) diferenciaram-se. Duração: 25 a 35 horas após a deposição na câmara de incubação.
- Estágio 4. **Maturação embrionária média.** O olho pigmentado (1) é evidente e as antenas são desenvolvidas, mas confinadas dentro da segunda membrana embrionária. Duração: 35 a 45 h após a deposição na câmara de incubação.
- Estágio 5. **Maturação embrionária tardia.** A segunda membrana embrionária se rompeu e as segundas antenas (1) estão parcialmente estendidas. As cerdas anteriores (2) são pouco desenvolvidas e o espinho caudal (3) é dobrado contra a carapaça. Duração: 45 a 50 h após a deposição na câmara de incubação.
- Estágio 6. **Neonato totalmente desenvolvido.** As segundas cerdas das antenas (1) são desenvolvidas, e o espinho caudal (1) é totalmente estendido a partir da carapaça. O organismo está nadando livremente.

#### 3.4.2. Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*

Soluções estoque dos quatro fármacos foram preparados em meios de cultivo próprios de cada organismo, ficando sob agitação por 30 minutos para a completa solubilização dos compostos. As soluções estoques dos antivirais individuais foram preparados nas seguintes concentrações: 20 mg.L<sup>-1</sup> de aciclovir, 5 mg.L<sup>-1</sup> para efavirenz, 20 mg.L<sup>-1</sup> de lamivudina e 20 mg.L<sup>-1</sup> para zidovudina.

A solução estoque de EFV (5 mg.L<sup>-1</sup>), foi preparada dissolvendo-se o composto em 0,01% de metanol, v/v. Este procedimento foi necessário devido à baixa solubilidade do fármaco em água: 0,00855 mg.mL<sup>-1</sup> (PRASSE et al., 2010).

O cultivo de *C. dubia* permaneceu em condições controladas com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo com 16 de luz:8 h de escuro e iluminação de 1200 lux. Os organismos foram mantidos em água reconstituída com pH 7,2 - 7,6 e dureza entre 44 - 47 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>, como recomendado pela NBR 13373 (ABNT, 2017). A troca total da água de cultivo era realizada duas vezes por semana, evitando diferenças de temperatura maiores que 2°C. Estes microcrustáceos foram alimentados diariamente com uma suspensão da alga clorofícea *R. subcapitata* (10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>).

Neonatos com idade entre 6 e 24h de vida foram selecionados. 3 experimentos em momentos distintos foram realizados para os 4 antivirais, cada ensaio consistiu de 5 concentrações mais o grupo controle com 10 réplicas por concentração e 1 organismo-teste em cada réplica. Cada organismo-teste foi mantido em tubos de ensaio com 10 mL da solução-teste ou 10 mL de água reconstituída (controle). Os experimentos permaneceram em incubadoras por um período de 8 dias com fotoperíodo (16 horas de luz e 8 horas de escuro), com controle de temperatura ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), em regime semiestático (troca total das soluções experimentais a cada 2 dias), com monitoramento dos parâmetros pH, dureza e oxigênio a cada troca.

Para os ensaios as seguintes concentrações foram preparadas:

- Aciclovir: 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 mg.L<sup>-1</sup>
- Efavirenz: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg.L<sup>-1</sup>
- Lamivudina: 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg.L<sup>-1</sup>
- Zidovudina: 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 mg.L<sup>-1</sup>

O controle foi preparado apenas com água de cultivo, livre de fármacos.

Durante 8 dias, os organismos foram verificados diariamente quanto à mortalidade e a prole foi contabilizada e retirada do tubo de ensaio. O parâmetro biológico avaliado foi o número de neonatos.

### 3.4.3. Ensaio de toxicidade crônica com *Raphidocelis subcapitata*

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar com os fármacos a fim de determinar a faixa de concentração que causam efeitos subletais. O ensaio de definitivo (96 horas) foi realizado de acordo com o protocolo da NBR 12648 (ABNT, 2018) para o ensaio de toxicidade com algas clorofíceas.

Para cada fármaco, três ensaios independentes foram realizados, todos em triplicata com a exposição das microalgas em cinco concentrações de aciclovir (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>), seis de efavirenz (0,00781; 0,01562; 0,03125; 0,0625; 0,125 e 0,25 mg L<sup>-1</sup>), cinco de lamivudina (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>) e cinco de zidovudina (1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>), além do controle negativo mantido com meio de cultivo LC Oligo e o controle positivo preparado com cloreto de potássio (KCl) nas concentrações de 20, 10, 5, 2,5 g L<sup>-1</sup>.

Após o preparo do inóculo no meio de cultivo, este foi mantido em incubação por um período de 3 a 7 dias, em agitação contínua, temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e iluminação constante de 2400 lux. Esta cultura foi utilizada como inóculo na montagem do ensaio, encontrando-se em fase exponencial de crescimento. No dia do ensaio, retirou-se uma alíquota do inóculo e em seguida, contabilizou-se o número de células algáceas.

Antes dos ensaios, todos os frascos Erlenmeyer e o meio de cultivo LC Oligo foi esterilizado ( $121^\circ\text{C}$  por 30 min). Os frascos possuem 150 mL de capacidade contendo 50 mL de solução-teste ou meio de cultura livre de contaminantes (controle). No caso do Efavirenz, foi necessário adicionar um controle do solvente (meio de cultura + metanol) com uma concentração nominal de 0,01% de metanol (v/v).

Os frascos-teste foram inoculados com uma concentração inicial de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e mantidos sob iluminação de 2400 lux, areação contínua e temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), condições essas, controladas em uma incubadora (modelo 411/FPD Novaética). A norma NBR 12648 (ABNT, 2018) recomenda que o volume inoculado em cada frasco deve ser de 0,1 a 1 mL e que a concentração inicial seja de  $10^3$  células.mL<sup>-1</sup> e  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. A quantidade de inóculo a ser adicionada à amostra foi calculado pela Equação 1:

$$V_i = \frac{V_f \times C_i}{N} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

$V_i$  = Volume do inóculo em mL;

$V_f$  = Volume final da solução-teste em mL;

$C_i$  = Concentração inicial de células no recipiente-teste, em células/mL

$N$  = Número de células/volume da suspensão, em células/mL

Os frascos-teste foram inoculados com uma concentração inicial de  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> e mantidos sob as mesmas condições (iluminação, temperatura, agitação e meio) descritas para o cultivo das algas. Três réplicas foram usadas por concentração e um total de 3 ensaios independentes foram realizados.

Os ensaios foram realizados em frasco Erlenmeyer de vidro de 150 mL de capacidade contendo 50 mL de solução-teste ou meio de cultura livre de contaminantes (controle). No caso do Efavirenz, foi necessário adicionar um controle do solvente (meio de cultura + metanol) com uma concentração nominal de 0,01% de metanol (v/v).

Os experimentos permaneceram em uma mesa agitadora Orbital Nova Técnica, modelo NT 155 (100 rpm) no interior da incubadora por 96 horas com controle de temperatura, nas condições descritas anteriormente. Para a determinação da concentração de células das microalgas utilizou-se o método de contagem em câmara de Neubauer com um microscópio óptico Nikon – Eclipse E200.

Após a exposição e a contagem da quantidade de células na câmara de Neubauer, foi calculada a porcentagem de inibição pela comparação de cada amostra com o controle, utilizando-se a Equação 2:

$$\% \text{ IC} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

% IC: inibição percentual na taxa média de crescimento

Ac: valor médio para taxa de crescimento específico médio no grupo controle

At: taxa média de crescimento específico para cada réplica do tratamento.

Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$  desvio padrão) da inibição percentual do crescimento celular (% I) da amostra em comparação com o controle negativo ( $p \leq 0,05$ ). Com a determinação da densidade celular, foi possível obter os valores das Concentrações de Inibição de 50% (CI50) do crescimento da população de algas e os valores de CENO e CEO.

### 3.5. Análise de Risco Ambiental

O risco ambiental desses antivirais foram avaliados com base no escopo regulatório da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2006) e em alguns autores (FERNANDEZ et al., 2010; ZHAO et al., 2010).

Os valores de quocientes de risco (RQs) para organismos aquáticos foram calculados a partir da concentração ambiental medida (MEC) em águas superficiais e a concentração prevista sem efeito (PNEC) (obtidos a partir da bateria de bioensaios realizados no presente estudo).

Para os valores de MEC, foram considerados dados da literatura e de acordo com o compilado da Tabela 5, o maior valor quantificado para cada antiviral encontrado em águas superficiais foi utilizado.

O PNEC foi calculado individualmente a partir dos ensaios ecotoxicológicos para cada antiviral selecionado. O PNEC foi calculado aplicando um fator de avaliação (FA) de 10 ao valor de  $CE_{50}$  ou CENO das espécies aquáticas (Equação 3). O FA é uma expressão do grau de incerteza na extrapolação de um número limitado de espécies para ecossistemas complexos no ambiente real e é responsável por variações intra e interespecies na sensibilidade, e dados laboratoriais para extrapolação de impacto em campo (EMA, 2006).

$$PNEC = \frac{CENO \text{ ou } CE_{50}}{10} \quad \text{Eq. 3}$$

Os valores de RQ para organismos aquáticos foram estabelecidos com base na razão entre as concentrações ambientais medidas (MEC) (no presente estudo, o MEC foi obtido a partir de dados da literatura) e a concentração prevista sem efeitos (PNEC) cujos dados foram obtidos a partir da bateria de bioensaios realizados no presente estudo (Equação 4).

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

RQ: quociente de risco;

MEC: concentração ambiental medida;

PNEC: concentração prevista sem efeitos

A partir dos RQs resultantes, pode-se fazer uma avaliação do risco que cada fármaco apresenta para cada organismo aquático analisado. Um critério de classificação de risco utilizado por Hernando et al., (2006) foi aplicado:

- $RQ < 0,1$  significa risco mínimo;
- $0,1 \leq RQ < 1$  significa risco mediano;
- $RQ \geq 1$  significa alto risco.

### 3.6. Análise de risco ambiental de misturas

Para a análise de risco ambiental de misturas utilizou-se o modelo proposto por Backhaus e Faust (2012). O RQ para a mistura com base nas razões MEC/PNEC ( $RQ_{MEC/PNEC}$ ) e o RQ para a mistura com base em unidades tóxicas ( $RQ_{STU}$ ) são modelos aceitáveis e amplamente utilizados. Para avaliar o risco de uma mistura química, duas abordagens possíveis foram consideradas:

Abordagem I: O quociente de risco (RQ) de uma determinada mistura é estimado como sendo a soma das relações Concentração Ambiental\*/PNEC individuais de cada componente da mistura.

\*Concentração Ambiental, que pode ser modelada (Concentração Ambiental Prevista, PEC), medida (Concentração Ambiental Medida, MEC), ou que pode representar a concentração próxima a uma saída de efluente (Concentração Ambiental Introdutória). PNEC representa a concentração prevista sem efeitos, de acordo com a diretriz da European Chemicals Agency (ECHA, 2008). Para essa abordagem, será utilizada a Equação 5:

$$RQ_{MEC/PNEC} = \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{PNEC_i} = \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{\min(EC50_{fish}, EC50_{invertebrates}, EC50_{algae})} \times 1/AF \quad 5 \quad \text{Eq. 5}$$

Abordagem II: A soma das unidades tóxicas (STU, com uma unidade tóxica sendo  $TU = \text{Concentração ambiental}/CE_{50}$ ) é calculada em uma primeira etapa para cada um dos principais níveis tróficos (geralmente algas, invertebrados, peixes). O quociente de risco final ( $RQ_{STU}$ ) para a mistura é então igual à soma das unidades tóxicas do nível trófico mais sensível multiplicado pelo Fator de Avaliação (AF) correspondente, que é definido como 1000 se os dados representarem valores de

CE<sub>50</sub> de estudos de toxicidade com algas, invertebrados e peixes (ECHA, 2008). Esta estimativa de risco será denominada RQ<sub>STU</sub> e é calculado conforme a Equação 6.

$$RQ_{STU} = \max(STU_{fish}, STU_{invertebrates}, STU_{algae}) \times AF$$

$$= \max \left( \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{PNEC_{i, fish}}, \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{PNEC_{i, invertebrates}}, \sum_{i=1}^n \frac{PEC_i}{PNEC_{i, algae}} \right) \times AF$$
Eq. 6

Ambas as abordagens são baseadas nos mesmos dados de entrada, ou seja, estimativas da concentração ambiental para cada composto e dados da toxicidade crônica para as algas, invertebrados e peixes. No entanto, eles diferem na ordem das análises.

### 3.7. Análises estatísticas dos ensaios de toxicidade

Para os ensaios de toxicidade crônica, todos os 4 antivirais foram testados 3 vezes (três ensaios independentes). Os valores de CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> foram determinados como as concentrações estimadas nas quais 50% da reprodução de *C. dubia* foi afetada e o crescimento da população de *R. subcapitata* foi inibido em 50%, respectivamente, conforme determinado no software GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia EUA, 2007) usando regressão não linear com um intervalo de confiança de 95%.

Todos os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados isoladamente com 10 repetições por concentração no caso de *C. dubia* e 3 repetições por concentração para *R. subcapitata*. Os resultados foram analisados com o software GraphPad 5.0. Para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido dos testes post-hoc de Dunn's. As diferenças significativas dos dados foram estabelecidas quando  $p = 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resultados do ensaio crônico com *Raphidocelis subcapitata*

Durante o ensaio de toxicidade crônica com *R. subcapitata*, os valores de pH das soluções permaneceram na faixa de 7,6 a 8,0, a temperatura variou entre 24,5 e 26 ° C e a dureza entre 45 e 48 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Todas as condições estavam de acordo com a NBR 12648 (ABNT, 2018).

Nos experimentos com o efavirenz, não houve diferença significativa entre os resultados do controle e do controle com o solvente, excluindo a possibilidade de efeitos do solvente (0,01% de metanol) sobre os resultados de toxicidade.

Os valores de Cl<sub>50</sub>, CEO e CENO dos 4 antivirais para *R. subcapitata* estão apresentados na Tabela 13. Os valores representam a média dos 3 experimentos independentes, a partir destes resultados de Cl<sub>50</sub> verificou-se que toxicidade crônica com *R. subcapitata* dos antivirais aumentou na ordem de EFV > 3TC > ACV > AZT. O antiviral mais tóxico para as algas foi o efavirenz: o CENO e o Cl<sub>50</sub> foram 0,00781 mg L<sup>-1</sup> e 0,034 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

No ensaio de inibição do crescimento de algas, não foi possível determinar os valores de CEO e CENO para o antirretroviral AZT, devido ao efeito hormese ocasionado pelo fármaco conforme evidenciado na Tabela 13.



Tabela 13 - Toxicidade crônica dos antivirais para o organismo *R. subcapitata*.

<b>Fármacos</b>	<b>CI<sub>50</sub></b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CENO</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CEO</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Aciclovir</b>	3,612 (3,249-4,016)	1,25	2,5
<b>Efavirenz</b>	0,034 (0,031-0,038)	0,00781	0,01562
<b>Lamivudina</b>	3,013 (2,753-3,297)	1,25	2,5
<b>Zidovudina</b>	5,442 (4,969-5,962)	Nd	Nd

CI<sub>50</sub>: Concentração Inibitória; CENO: Concentração de Efeito Não Observado; CEO: Concentração de Efeito Observado; Intervalos de confiança de 95% estão entre parênteses; Nd: Não determinado.

As curvas de dose-resposta geradas no ensaio de Inibição de Crescimento a partir dos resultados experimentais com os antivirais são mostradas na Figura 17. Os testes de toxicidade crônica (96h) mostraram que todos os compostos apresentaram concentrações que inibiram significativamente a taxa de crescimento de microalgas *R. subcapitata*, exceto zidovudina, para a qual um aumento significativo de microalgas foi encontrado a uma concentração de 1,25 mg L<sup>-1</sup> indicando um efeito de hormese (Figura 17d). Hormese é um fenômeno caracterizado por uma estimulação da resposta de um organismo (por exemplo, crescimento, reprodução) em baixas concentrações de uma substância química (CALABRESE et al., 1999).

No teste de microalgas mostrado na Figura 17a, o aciclovir inibiu significativamente o crescimento da alga nas concentrações de 2,5 a 20 mg L<sup>-1</sup> em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Para o efavirenz, foi observada inibição significativa do crescimento ( $p < 0,05$ ) em populações de *R. subcapitata* expostas a concentrações de 0,016 a 0,25 mg L<sup>-1</sup> (Figura 17b) e concentrações de 2,5 a 20 mg

L-1 de lamivudina significativamente inibidas ( $p < 0,05$ ) crescimento de microalgas (Figura 17c).

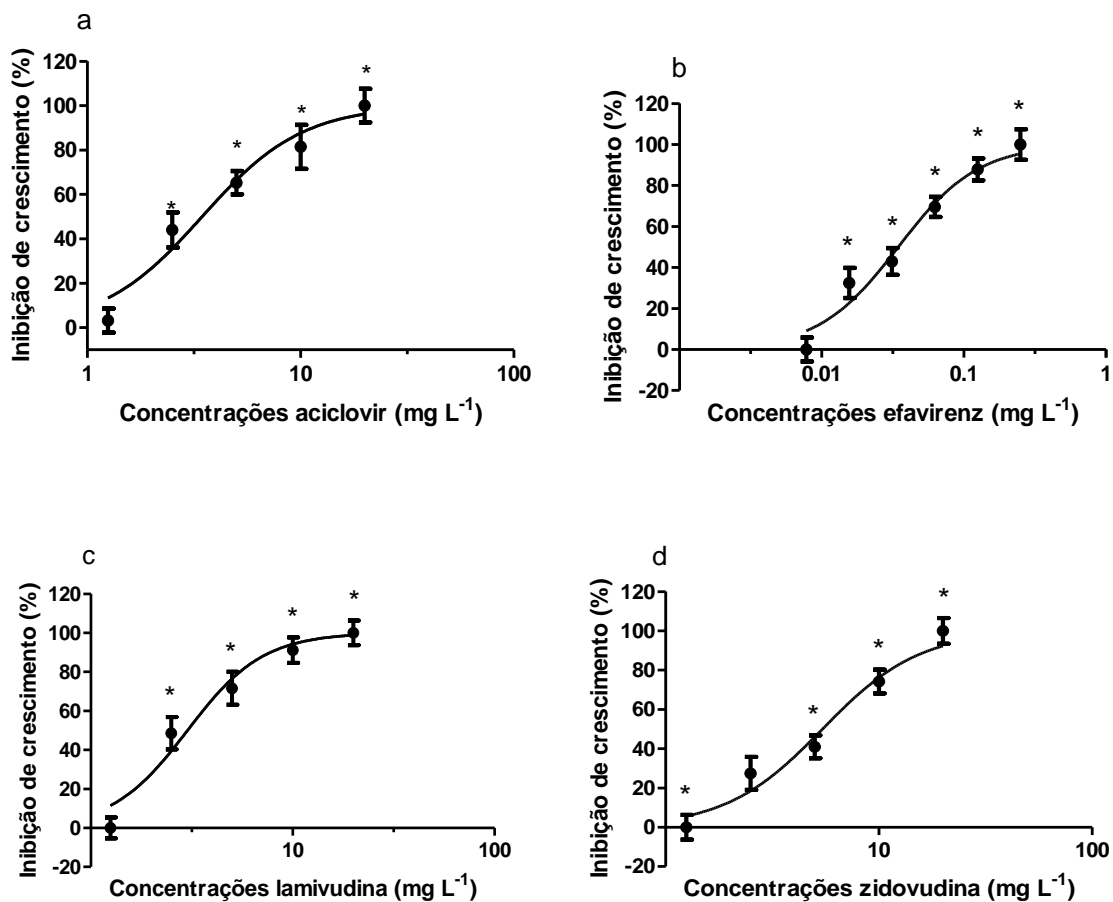


Figura 17 - Inibição do crescimento de algas *R. subcapitata* expostas aos fármacos aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina. Os dados representam intervalos de confiança médios de 95%, apresentados como curvas de resposta da concentração logarítmica da taxa de inibição do crescimento após 96 h de exposição. As diferenças significativas em comparação com o controle são marcadas com um símbolo \* ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Resultados do ensaio crônico com *Ceriodaphnia dubia*

A faixa de todos os parâmetros abióticos medidos durante exposições crônicas estão de acordo com a NBR 13373 (ABNT, 2017). Para o ensaio crônico com *C. dubia*, o pH das soluções teste varia entre 7,2 e 7,6, dureza entre 44 e 48 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e temperatura entre 23 e 26 °C. Em todos os experimentos, a mortalidade no grupo controle foi inferior a 10%. Nos experimentos realizados com efavirenz, não houve diferença significativa entre os resultados do controle e do controle com o solvente. Isso exclui a possibilidade de efeitos do solvente (0,01% de metanol) nos resultados de toxicidade com *C. dubia*.

Os resultados dos testes crônicos da *Ceriodaphnia dubia* apresentados na Tabela 14 mostram uma variação na toxicidade entre os antivirais, com a seguinte ordem crescente com base na CE<sub>50</sub>: zidovudina <aciclovir <lamivudina <efavirenz. O antiviral mais tóxico para *C. dubia* foi o efavirenz, os valores de CENO e CE<sub>50</sub> obtidos foram 0,016 mg L<sup>-1</sup> e 0,026 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

No ensaio de toxicidade crônica utilizando *C. dubia*, não foi possível determinar os valores de CEO e CENO para o antirretroviral AZT, devido ao efeito hormese ocasionado pelo fármaco.

Tabela 14 - Toxicidade crônica dos antivirais para o organismo *C. dubia*.

<b>Fármacos</b>	<b>CE<sub>50</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CENO (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>CEO (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Aciclovir</b>	3,062 (2,529 -3,707)	1,25	2,5
<b>Efavirenz</b>	0,026 (0,024-0,027)	0,016	0,031
<b>Lamivudina</b>	1,345 (1,242-1,456)	0,625	1,25
<b>Zidovudina</b>	5,671 (5,370-5,989)	Nd	Nd

CE<sub>50</sub>: Concentração Efetiva; CENO: Concentração de Efeito Não Observado; CEO: Concentração de Efeito Observado; Intervalos de confiança de 95% estão entre parênteses; Nd: Não determinado.

O número médio de neonatas/fêmea obtidos para *C. dubia* nos experimentos com os antivirais estão apresentados na Figura 18. Os resultados dos testes de toxicidade crônica mostraram que as concentrações testadas de aciclovir, efavirenz e lamivudina causam redução na frequência de neonatos das fêmeas de *C. dubia* (Figuras 18a-c). No entanto, efeitos sinérgicos nas concentrações de 1,25 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de AZT também foram observados (Figura 18d). O aciclovir causou diminuição significativa na frequência de neonatos expostos a concentrações de 2,5 a 20 mg L<sup>-1</sup> quando comparadas ao grupo controle pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ) (Figura 18a). Uma diminuição significativa na fertilidade ( $p < 0,05$ ) foi observada nos organismos-teste expostos a concentrações de 0,031 a 0,25 mg L<sup>-1</sup> de efavirenz, que provou ter a mais alta toxicidade em relação aos demais antivirais do estudo (Figura 18b). Para a lamivudina, foi observada redução significativa na frequência dos neonatos ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de 1,25 a 10 mg L<sup>-1</sup> (Figura 18c).

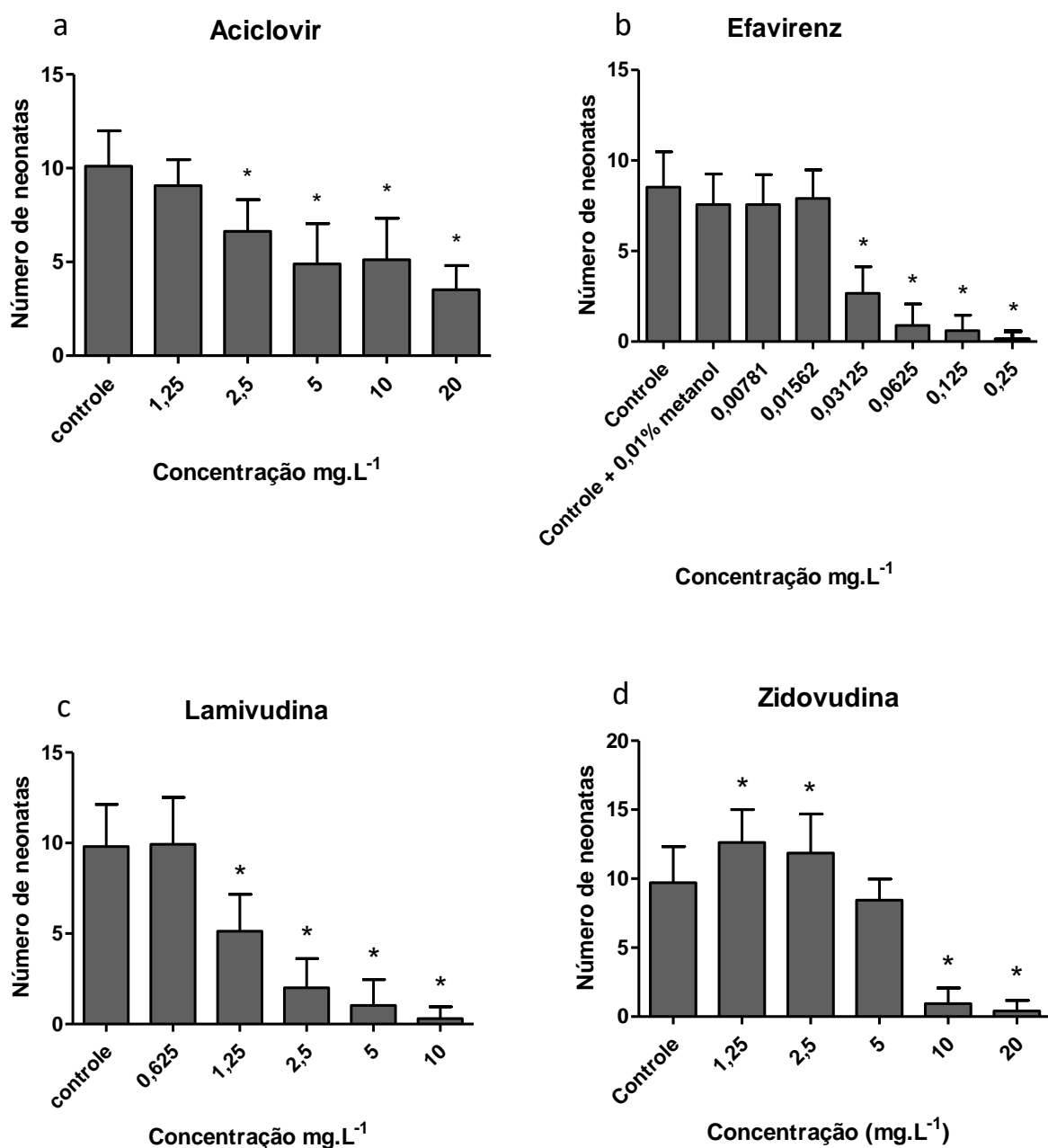


Figura 18 - Respostas reprodutiva de *C. dubia* expostas por 8 dias ao aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina. As barras de erro correspondem ao erro padrão e o asterisco representa estatisticamente diferente (teste de Dunnett,  $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle.

### 4.3. Discussão dos dados de toxicidade crônica

A Diretiva da UE 93/67/EEC (Comissão das Comunidades Europeias, 2003) classifica as substâncias de acordo com seus valores  $CE_{50}$  para organismos aquáticos como segue: muito tóxico ( $CE_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), tóxico ( $CE_{50} = 1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ ), e prejudicial ( $CE_{50} = 10 - 100 \text{ mg L}^{-1}$ ). As substâncias com um  $CE_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$  não seriam classificadas. No presente estudo, os antivirais ACV, 3TC e AZT foram classificadas como tóxicos, enquanto EFV foi uma substância muito tóxica.

Uma outra classificação de substâncias perigosas no ambiente aquático consta no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (ONU, 2015), este documento fornece uma base global de informações físicas, ambientais e de saúde e segurança para substâncias e misturas químicas. Com base na classificação da ONU (2015), os dados da  $CE_{50.96h}$  para os organismos cujos valores variam entre 1 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  são classificados como tóxicos. Os antivirais deste estudo, exceto o efavirenz, estão dentro desses valores. O Efavirenz seria enquadrado como muito tóxico.

O Software Ecological Structure Activity Relationships (ECOSAR v1.10) da U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) estima as toxicidades aquáticas e tem sido muito utilizado para análise de risco de contaminantes orgânicos emergentes (SANDERSON et al., 2004, IATROU et al., 2014), esse software baseia-se na similaridade da estrutura com outros compostos cuja toxicidade no ambiente aquático foi previamente analisada (THOMAIDI et al., 2015). A toxicidade aguda do aciclovir foi estimada para peixes e daphnias, nos seguintes valores:  $1,76 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$  e  $69,2 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores são muito superiores aos encontrados neste estudo, isso deve-se ao fato de os ensaios serem agudos, geralmente expondo o organismo a um curto período do seu ciclo de vida e serem observados critérios como letalidade ou imobilidade.

Os valores crônicos do aciclovir previstos pelo ECOSAR foram estimados em  $3,89 \text{ mg L}^{-1}$  para peixes,  $2,04 \text{ mg L}^{-1}$  para *Daphnia* sp. e  $3,62 \text{ mg L}^{-1}$  para microalgas. Os valores de toxicidade crônica encontrados neste estudo para o ensaio de ACV com *C. dubia* e *R. subcapitata* foi de  $3,062 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3,612 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, mostrando semelhança com os dados apresentados no ECOSAR.

A estrutura molecular dos compostos e suas formas dissociadas em diferentes valores de pH podem influenciar na biodisponibilidade no processo de absorção e a

toxicidade dos organismos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2014). O pH da água é um fator ambiental importante que limita a distribuição das espécies em habitats aquáticos (SCHWANKE, 2013). O estado de ionização é controlado pelo pH da solução e pelas constantes de dissociação ácida das substâncias (ou seja, valores de pKa) (BABIĆ et al., 2007). Com base nos valores de pKa de aciclovir (3,02 e 11,98), zidovudina (-3 e 9,96), lamivudina (-0,16 e 14,29) e efavirenz (-1,5 e 12,52) na faixa de pH 7, ACV, EFV e antivirais 3TC são principalmente (acima de 99%) em sua forma neutra, enquanto o AZT está predominantemente em sua forma catiônica (Figura 19). Essas diferentes espécies químicas (catiônicas, neutras ou aniônicas) geralmente têm propriedades muito diferentes, como solubilidade em água, volatilidade, absorção de UV e reatividade com oxidantes químicos (BABIĆ et al., 2007).

A estrutura molecular de compostos químicos pode ser útil para deduzir o porquê da toxicidade. Os antivirais são compostos orgânicos. Aciclovir e zidovudina têm 5 e 3 átomos de nitrogênio em sua molécula, respectivamente. A lamivudina contém 3 átomos de nitrogênio e 1 átomo de enxofre, enquanto o efavirenz possui 1 átomo de nitrogênio, 3 átomos de flúor e 1 cloro.

Ao visualizarmos a estrutura do efavirenz na Figura 19, identificamos a presença de 3 átomos de Flúor que é o elemento químico mais eletronegativo e reativo de todos sendo tóxico e extremamente corrosivo, sendo altamente perigoso, causando sérios danos como queimaduras químicas em contato com pele e mucosas (MARRÓ, 2019).

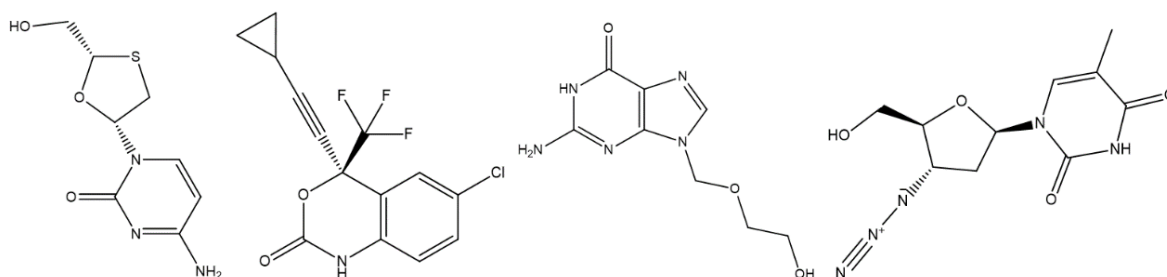


Figure 19 - Espécies predominantes de aciclovir, efavirenz, lamivudina e zidovudina, respectivamente, em pH 7.

Neste estudo, o aumento do número de neonatos por fêmea de *C. dubia* e o aumento da população de microalgas expostas a baixas concentrações podem ter

sido causados pela presença de nitrogênio na molécula de zidovudina. O teste de toxicidade foi realizado em pH variando de 7,2 a 7,6. Nessa condição, a espécie predominante da molécula de AZT está representada na Figura 19 com cargas positivas e negativas do nitrogênio no final da cadeia o que para as microalgas e alguns outros microrganismos fixadores de nitrogênio o utilizam como fonte de energia (BOYD, 2015). De acordo com Babić et al. (2007), a forma ionizada é geralmente mais solúvel em água, enquanto a forma neutra é mais lipofílica e possui maior permeabilidade de membrana.

Os dados obtidos nos ensaios de toxicidade crônica neste estudo com *C. dubia* mostraram que o AZT causou redução da frequência de neonatos das fêmeas nas concentrações de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> e alta inibição do crescimento em *R. subcapitata* nas concentrações testadas (5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>). No entanto, efeitos estimulantes (hormese) ao AZT também foram observados. Neste estudo, o efeito de hormese foi verificado no teste com a microalga na concentração de 1,25 mg L<sup>-1</sup>, o que representou um estímulo de 33,15% em relação ao controle.

O AZT é conhecido por ser um fármaco citostático e que pode interferir em importantes funções fisiológicas em organismos não-alvo, causando danos moleculares. O mecanismo de ação ocorreria por meio de: (i) inibição de nucleotídeos ou na síntese de DNA (GARCIA-CANTON et al., 2013) e (ii) indução de mutações, micronúcleos e genotoxicidade (VON TUNGELN et al., 2002). A genotoxicidade do AZT foi demonstrada por Onwuamah et al. (2014) utilizando a raiz de *Allium cepa*, os autores identificaram efeitos como inibição do crescimento radicular, alterações na mitose e indução de aberrações cromossômicas.

Os resultados obtidos neste estudo para *C. dubia* (CE<sub>50</sub>: 0,026 mg L<sup>-1</sup>) e para *R. subcapitata* (CI<sub>50</sub>: 0,034 mg L<sup>-1</sup>) usando Efavirenz mostram que este antiviral foi o mais tóxico para ambas as espécies, sugerindo que concentrações ambientais podem afetar a biota exposta.

Ambas as espécies deste estudo são importantes no ecossistema aquático. Como produtores primários, as algas formam a base das cadeias alimentares aquáticas, desempenhando um papel importante na manutenção do equilíbrio dos corpos d'água; no entanto, eles são conhecidos por serem relativamente sensíveis a produtos químicos (CESCHIN e SCALICI, 2021). *Ceriodaphnia dubia* é um zooplâncton de regiões temperadas e desempenha um papel importante nas cadeias alimentares de habitats de água doce em todo o mundo, além de ser uma espécie de



teste padronizado (THAYSEN et al., 2018). A alta inibição do crescimento de *R. subcapitata* e o efeito tóxico na reprodução de *C. dubia* pelo fármaco EFV, é preocupante, pois pode afetar o ciclo dessas espécies e a vida aquática em níveis tróficos mais elevados.

O software ECOSAR estimou os valores de toxicidade crônica do EFV em 0,13 mg L<sup>-1</sup> para peixes, 0,14 mg L<sup>-1</sup> para *Daphnia* sp. e 0,68 mg L<sup>-1</sup> para microalgas. O valor crônico calculado para os dados desta pesquisa foi de 0,026 mg L<sup>-1</sup> para *C. dubia* e 0,034 mg L<sup>-1</sup> para a microalga *R. subcapitata* o que representa valores bem abaixo dos dados do ECOSAR.

A toxicidade de compostos farmacêuticos em organismos aquáticos presumivelmente depende do modo de ação dos compostos (DIETRICH et al., 2010). Os resultados deste estudo sugerem que exposições crônicas ao efavirenz em concentrações ambientais relevantes afetem a biota exposta, considerando o seu mecanismo de ação. Estudos têm demonstrado que o EFV possui ação mitotóxica, podendo interferir em organismos não-alvo, uma vez que organismos como *C. dubia* e *R. subcapitata* possuem mitocôndrias. O fármaco desencadeia uma disfunção mitocondrial caracterizada por uma inibição direta do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons, uma diminuição no consumo de O<sub>2</sub>, um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial (APOSTOLOVA et al., 2017; FUNES et al., 2014).

Além de sua mitotoxicidade, estudos demonstraram a presença de lesões hepáticas com a exposição ao EFV. Robson et al. (2017) investigaram a exposição (96 h) do peixe *Oreochromis mossambicus* a uma concentração de EFV de 20,6 ng L<sup>-1</sup>, resultando em danos ao fígado e declínio geral da saúde desta espécie, indicando a importância do monitoramento do efavirenz.

Alguns estudos quantificaram a lamivudina em águas superficiais em concentrações que variam de 11,5 ng L<sup>-1</sup> a 167 µg L<sup>-1</sup> no Quênia (NGUMBA et al., 2016; K'OREJE et al., 2016), em águas superficiais em concentrações máximas de 11,5 e 242 ng L<sup>-1</sup> (NGUMBA et al., 2016; MTOLO et al., 2019) e efluente em concentrações que variam de 55 ng L<sup>-1</sup> a 405 µg L<sup>-1</sup>.

Um estudo recente relatado por Omotola et al. (2021) empregou uma bateria de bioensaios de ecotoxicidade para avaliar a ameaça ambiental que a lamivudina representa para a fauna e flora aquáticas. *Daphnia magna*, avaliação da mutagenicidade pelo teste de Ames, ensaio de germinação de *Lactuca sativa* (alface)

e ensaio da ponta da raiz de *Allium cepa* foram realizados, testando lamivudina em duas concentrações (10 e 100 µg L<sup>-1</sup>). O ensaio de toxicidade de *Daphnia magna* revelou uma resposta estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com uma taxa de mortalidade de 85% na exposição a 100 µg L<sup>-1</sup> de lamivudina que aumentou para 100% na exposição de 48 horas. Na concentração de 10 µg L<sup>-1</sup> de lamivudina, taxas de sobrevivência de 90% e 55% foram observadas em 24 e 48 h, respectivamente. Nenhum efeito mutagênico potencial foi observado no teste de Ames em ambas as concentrações de lamivudina. Os bioensaios com *Allium cepa* revelaram um impacto adverso perceptível no comprimento da raiz na exposição a 100 µg L<sup>-1</sup> de lamivudina. Esse impacto foi investigado por meio de exame microscópico, revelando aberrações cromossômicas nas pontas das raízes expostas. O bioensaio com *Lactuca sativa* mostrou um efeito adverso significativo na taxa de germinação das sementes em comparação com o controle. O estudo concluiu que a lamivudina representa um risco ecológico para diferentes níveis tróficos, para flora e fauna, em concentrações anteriormente encontradas no meio ambiente.

Um outro estudo realizado por Franchi et al. (2009) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* mostraram que a lamivudina induziu efeitos mutagênicos e recombinogênicos causando instabilidade genômica e perda de heterozigosidade. Essas alterações genéticas desempenham um papel principal na carcinogênese e estão envolvidas em estágios secundários e subsequentes da carcinogênese.

A sensibilidade foi diferente entre os organismos-teste para os compostos investigados. A Figura 20 evidencia que a espécie *C. dubia* foi mais sensível a 3 antivirais (ACV, EFV e 3TC), já a alga *R. subcapitata* foi mais sensível ao AZT. Esta observação sugere que uma bateria de bioensaios usando organismos-teste pertencentes a vários grupos taxonômicos e representativos de vários níveis da cadeia alimentar é extremamente útil nas análises ecotoxicológicas e avaliações de risco ambiental

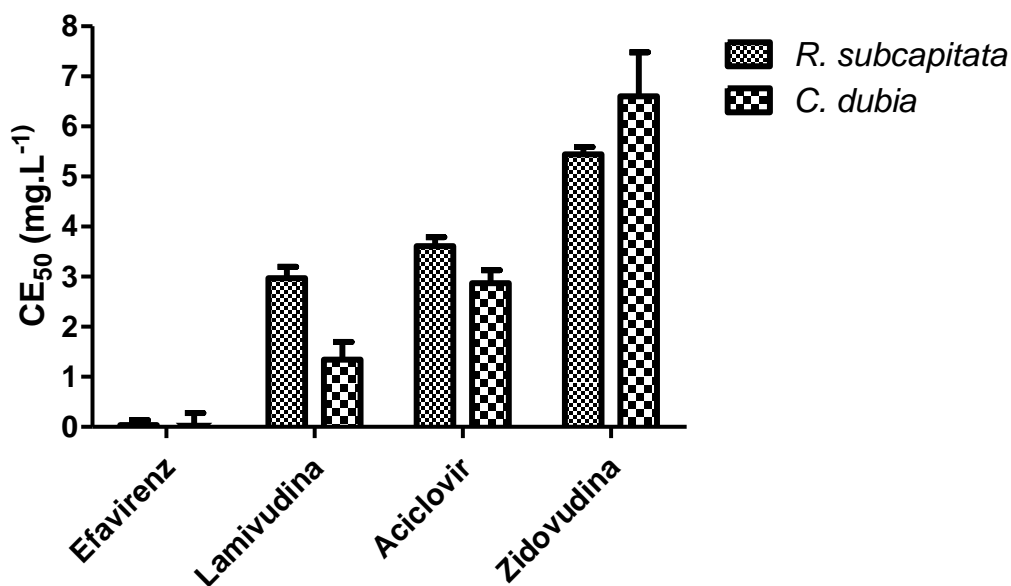


Figura 20 - Sensibilidade dos organismos-teste aos antivirais efavirenz, lamivudina, aciclovir e zidovudina.

#### 4.4. Análise de risco ambiental

O risco ambiental para organismos aquáticos foi avaliado para o pior cenário com base nos quocientes de risco (RQ) calculados usando o MEC máximo relatado em estudos anteriores (BRADLEY et al., 2014; MTOLO et al., 2019; K'OREJE et al., 2016) e PNECs do presente estudo (Tabela 15). O RQ para aciclovir foi 0,011 para *R. subcapitata* e *C. dubia*. O RQ para efavirenz foi 3,14 e 1,63 para *R. subcapitata* e *C. dubia*, respectivamente. Para o antiviral lamivudina, o RQ foi 1,33 e 2,69 para *R. subcapitata* e *C. dubia*, respectivamente; já o RQ para o antiviral zidovudina foi 0,03 para ambas as espécies. Considerando que a classificação de risco deve ser baseada no resultado mais sensível, o efavirenz e a lamivudina podem representar um alto risco para os organismos aquáticos.

Tabela 15 - Análise de risco ambiental para os antivirais.

Antiviral	MEC <sub>Água</sub> superficial (ng L <sup>-1</sup> )	PNEC <sup>a</sup> <i>R. subcapitata</i> (mg L <sup>-1</sup> )	RQ <i>R. subcapitata</i>	PNEC <sup>a</sup> <i>C. dubia</i> (mg L <sup>-1</sup> )	RQ <i>C. dubia</i>
Aciclovir	1410 <sup>b</sup>	0,125	0,011	0,125	0,011
Efavirenz	2450 <sup>c</sup>	0,00078	3,14	0,0015	1,63
Lamivudina	167100 <sup>d</sup>	0,125	1,33	0,062	2,69
Zidovudina	17410 <sup>d</sup>	0,544	0,03	0,567	0,03

Concentrações ambientais máximas medidas (MECs), concentração prevista sem efeitos (PNECs) e quocientes de risco (RQs) para cada antiviral.

<sup>a</sup> Valor ao dividir CENO ou CE<sub>50</sub> por um fator de avaliação de 10. Para zidovudina, foi usado CE<sub>50</sub>

<sup>b</sup>BRADLEY et al., 2014

<sup>c</sup>MTOLO et al., 2019

<sup>d</sup>K'OREJE et al., 2016

O Quociente de Risco foi calculado para ajudar a definir o status do problema em esforços futuros de avaliação de risco, determinando quais componentes ambientais podem ser potencialmente expostos a concentrações tóxicas de antivirais. Usando a classificação de Hernando et al. (2006), o valor do RQ para o efavirenz no rio Msunduzi na África do Sul foi > 1 para *C. dubia* e *R. subcapitata*, indicando que o fármaco representa um risco potencial para ambos os organismos. Esses altos valores de QR são o resultado de altas concentrações de EFV encontradas nos rios da África do Sul e da alta toxicidade da droga. A partir deste estudo, é evidente que *R. subcapitata* e *C. dubia* são muito suscetíveis à exposição ambiental ao efavirenz.

O RQ calculado para lamivudina no rio Ngong no Quênia para *C. dubia* foi de 2,69 (Tabela 4), indicando um alto risco para esta espécie, que é um cladóceros importante e indicador biológico de água doce e um risco médio para microalgas *R.*

*subcapitata*. A avaliação de risco para aciclovir e zidovudina indica valores RQ <1 determinando um baixo risco para as espécies estudadas.

Em relação aos anti-herpéticos, um estudo sobre a ecotoxicidade crônica do antiviral ganciclovir que utilizou *R. subcapitata* e *D. magna* como organismos de teste não revelou persistência ou bioacumulação. No mesmo estudo, uma comparação entre as concentrações ambientais previstas (PEC) e as concentrações previstas sem efeitos (PNECs) não revelou riscos significativos para águas residuais, águas superficiais, águas subterrâneas ou tratamento de sedimentos, enquanto os riscos potenciais para predadores aquáticos ou para água humana e os consumidores de peixe eram extremamente baixos (STRAUB, 2017). Como o ganciclovir, outro antiviral valganciclovir não apresentou riscos relevantes para organismos aquáticos e humanos que consomem água e peixes expostos aos seus resíduos.

A Comissão Europeia, através da Diretiva 2018/840/UE listou como prioritários algumas substâncias que representam um risco significativo para o ambiente aquático (CE, 2018). As substâncias incluídas no programa de monitorização são: 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, metiocarbe, neonicotinoides, antibióticos da família dos macrólidos, metaflumizona, amoxicilina, ciproflaxacina. É importante observar que nenhum antiviral está incluído como substância prioritária, sendo necessário mais estudos para incluí-los em listagens futuras.

#### 4.5. Análise de risco ambiental para mistura de antivirais

No presente estudo, foi avaliado o risco integrado das misturas de antivirais. Conforme destacado na metodologia, o RQ para a mistura com base nas razões PEC/PNEC ( $RQ_{PEC/PNEC}$ ) e o RQ para a mistura com base em unidades tóxicas ( $RQ_{STU}$ ) são dois métodos amplamente utilizados para estimar a combinação toxicidade de misturas de poluentes (AMATO et al., 2018; BACKHAUS e KARLSSON, 2014).

Em relação aos RQs para a mistura de antivirais, a Tabela 16 representa o  $RQ_{PEC/PNEC}$ ,  $RQ_{STU}$  e sua razão para toxicidade crônica de organismos pertencentes a 3 níveis tróficos. Os valores de  $RQ_{PEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$  foram 229,43 e 222,54 indicando alto risco para a alga, Ceriodaphnia e peixes. A razão de  $RQ_{PEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$  com base na toxicidade crônica atingiu valores de 1,03.

Tabela 16. RQ<sub>MEC/PNEC</sub>, RQ<sub>STU</sub> e sua razão, com base na toxicidade crônica.

	<b>Aciclovir</b>	<b>Efavirenz</b>	<b>Lamivudina</b>	<b>Zidovudina</b>
<b>CE<sub>50</sub> Alga</b>	13,38 µmol.L <sup>-1</sup>	0,107 µmol.L <sup>-1</sup>	13,14 µmol.L <sup>-1</sup>	20,36 µmol.L <sup>-1</sup>
<b>CE<sub>50</sub> Ceriodaphnia</b>	13,65 µmol.L <sup>-1</sup>	0,08 µmol.L <sup>-1</sup>	5,86 µmol.L <sup>-1</sup>	21,22 µmol.L <sup>-1</sup>
<b>CE<sub>50</sub> peixe</b>	17,26 µmol.L <sup>-1</sup>	0,41 µmol.L <sup>-1</sup>	62191,36 µmol.L <sup>-1</sup>	8,58 µmol.L <sup>-1</sup>
<b>MEC</b>	6,26 nmol.L <sup>-1</sup>	7,76 nmol.L <sup>-1</sup>	729 nmol.L <sup>-1</sup>	65 nmol.L <sup>-1</sup>
<b>PNEC resultante (AF 1000)</b>	13,38 nmol.L <sup>-1</sup>	0,08 nmol.L <sup>-1</sup>	5,86 nmol.L <sup>-1</sup>	8,58 nmol.L <sup>-1</sup>

$$RQ_{MEC/PNEC} = \frac{MEC_{Aciclovir}}{PNEC_{Aciclovir}} + \frac{MEC_{Efavirenz}}{PNEC_{Efavirenz}} + \frac{MEC_{Lamivudina}}{PNEC_{Lamivudina}} + \frac{MEC_{Zidovudina}}{PNEC_{Zidovudina}} = 229,43$$

$$RQ_{STU} \text{ (com base na soma das unidades tóxicas)} = \begin{aligned} &STU_{Alga}: \frac{MEC_{Aciclovir}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Efavirenz}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Lamivudina}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Zidovudina}}{CE_{50}} = 131,64 \times 10^{-3} \\ &STU_{Ceriodaphnia}: \frac{MEC_{Aciclovir}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Efavirenz}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Lamivudina}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Zidovudina}}{CE_{50}} = 222,54 \times 10^{-3} \\ &STU_{peixe}: \frac{MEC_{Aciclovir}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Efavirenz}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Lamivudina}}{CE_{50}} + \frac{MEC_{Zidovudina}}{CE_{50}} = 26,86 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

$$RQ_{STU} = \max(STU_{Alga}, STU_{Ceriodaphnia}, STU_{peixe}) \times AF = 222,54$$

$$RQ_{MEC/PNEC} / RQ_{STU} = 1,03$$

Os dados de toxicidade para o peixe foram coletados do banco de dados ECOSAR (ECETOC, 2003). RQ = quociente de risco, STU = soma das unidades tóxicas, PNEC = concentração prevista sem efeito, MEC = concentração ambiental medida, UT = MEC/CE<sub>50</sub>, AF = Fator de Avaliação (1000, de acordo com a European Chemicals Agency, 2006).

Valores de  $RQ_{MEC/PNEC} > 1$  também foram calculados em um estudo realizado por Petersen et al. (2013) em locais diferentes na Noruega, essa pesquisa avaliou o efeito combinado de produtos fitofarmacêuticos em riachos, rios e águas subterrâneas. Do total de 56 amostras, oito apresentaram valores de  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU} > 1$ , indicando um alto risco a misturas de produtos fitofarmacêuticos. As amostras de Hotranelva apresentaram  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$ , valores de 8,136 e 1,877, respectivamente. As amostras de Mørdrebekken (condado de Akershus), obtiveram valores de  $RQ_{MEC/PNEC} = 4,344$  e  $RQ_{STU} = 5,231$ . Uma amostra de Skuterudbekken (condado de Akershus) obteve  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$ , valores de 32,507 e 3,251, respectivamente. A amostra de Vasshaglona (condado de Aust-Agder), obteve valores de  $RQ_{MEC/PNEC} = 3,159$  e  $RQ_{STU} = 3,727$ .

Um estudo recente publicado por Kosma et al. (2020) revelou dados interessantes da análise de risco ambiental associados a alguns PFCs, os autores identificaram valores de  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU} > 1$  para reguladores de lipídeos, antibióticos, medicamentos psiquiátricos e estimulantes na toxicidade aguda e crônica o que representa um alto risco de toxicidade a longo prazo, com as algas sendo as espécies mais sensíveis.

Resultados semelhantes foram encontrados em sete efluentes de ETEs na Europa onde um  $RQ_{STU}$  de 16–48 foi relatado e a razão ficou entre 1,0 e 1,3 na toxicidade aguda (BACKHAUS e KARLSSON, 2014). Em um estudo conduzido no Lago Guchenghu na China por Zeng et al. (2018), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) apresentaram uma razão baseada na toxicidade crônica valores de até 1,62 evidenciando o alto grau de risco dos HPAs.



#### 4.6. Embriotoxicidade dos antivirais

Os efeitos de antivirais nos estágios de desenvolvimento embrionário de daphnias ainda não foram relatados. Devido à escassez de informações sobre esse assunto, o presente estudo foi realizado para determinar as anormalidades morfológicas, inibição no desenvolvimento e determinar os efeitos tóxicos nos estágios de desenvolvimento de *D. similis*. *D. similis* foi escolhida por razões ecológicas, pois é uma espécie abundante encontrada em ambientes aquáticos de água doce e um membro significativo da cadeia alimentar aquática.

##### 4.6.1. Aciclovir

Os efeitos do desenvolvimento embrionário promovidos pelo ACV em 96 horas nas concentrações testadas (0,125 a 2 mg L<sup>-1</sup>) são exibidos na Figura 21. A Figura 22(a-f) exibe as fotografias referentes à exposição dos embriões ao ACV. As anomalias incluíram: interrupção do desenvolvimento embrionário em 100% dos embriões na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> (Figura 22b) e 60% dos embriões apresentaram interrupção do desenvolvimento e 40% exibiram malformação na carapaça culminando com a morte dos organismos (Figura 22c) na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>. Na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> foi observado a presença de espinho curvado em 20% das Daphnias (4 de 20), 45% apresentaram anomalias na carapaça (Figura 22d). Na concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>, 5 das 20 (25%) daphnias tiveram seu desenvolvimento interrompido e 10% apresentaram anomalias na carapaça e nas antenas. Na menor concentração testada (0,125 mg L<sup>-1</sup>), 5% dos embriões exibiram anormalidades nas antenas e tiveram o seu desenvolvimento interrompido e 10% malformação na carapaça (Figura 22f).

Figura 21 – Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de aciclovir.

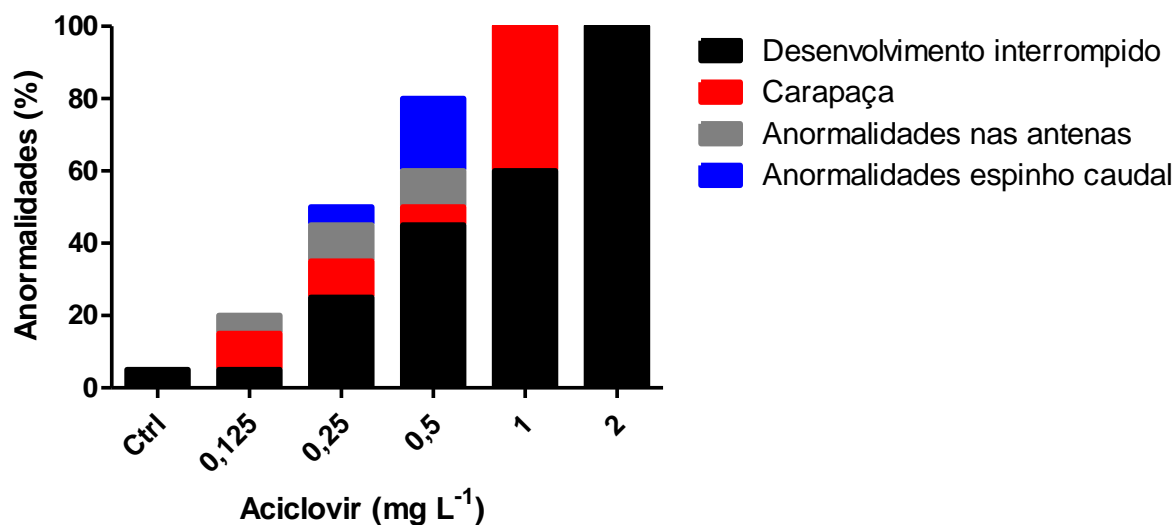
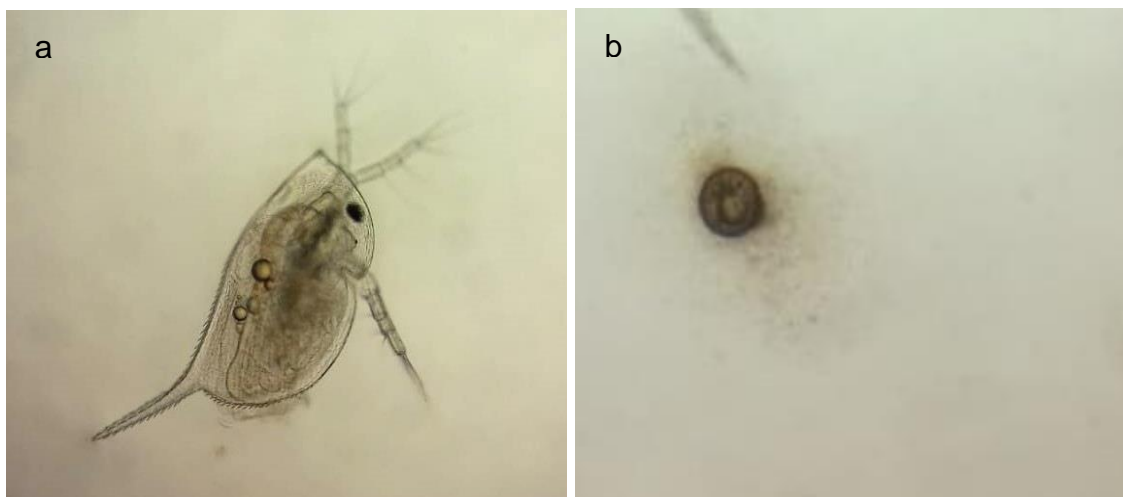
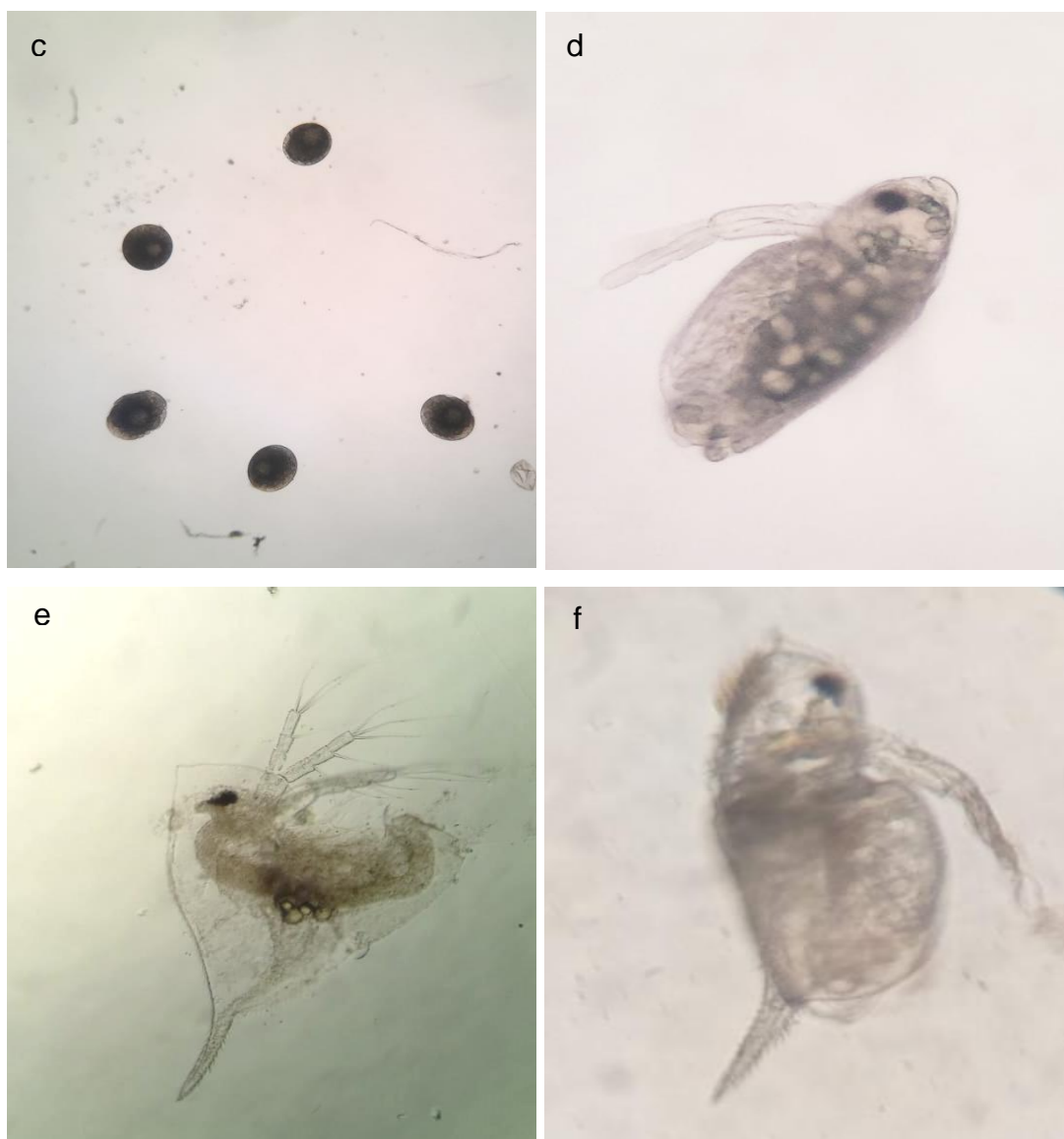


Figura 22 - Embriões de *Daphnia* expostos ao Aciclovir em 96 horas (a) controle, (b) 2 mg L<sup>-1</sup>, (c) 1 mg L<sup>-1</sup>, (d) 0,5 mg L<sup>-1</sup>, (e) 0,25 mg L<sup>-1</sup>, (f) 0,125 mg L<sup>-1</sup>.



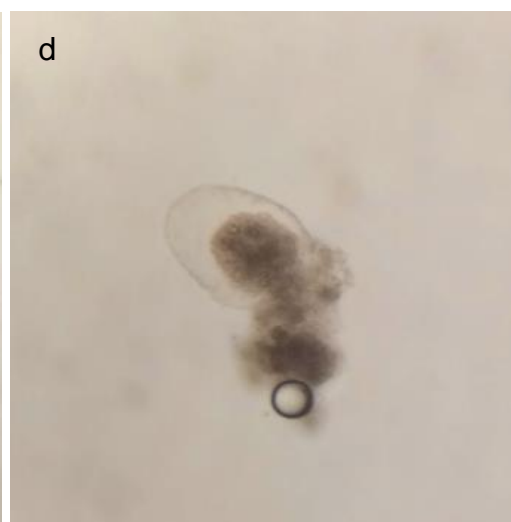
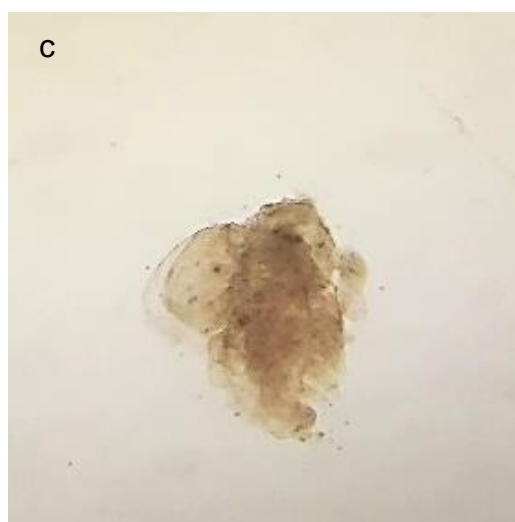
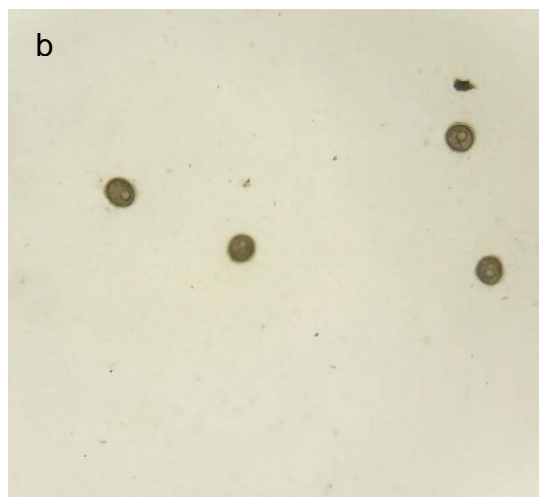
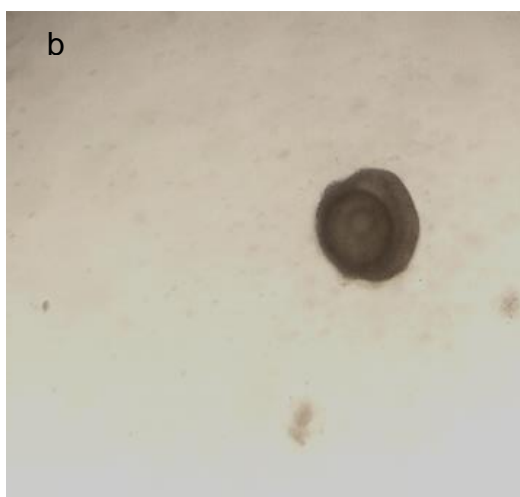


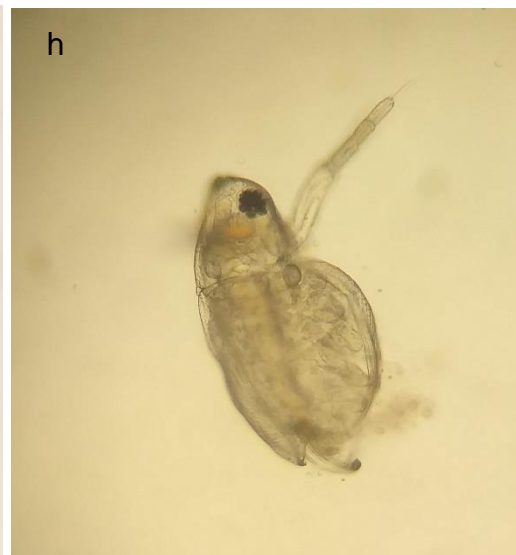
#### 4.6.2. Efavirenz

Os efeitos de desenvolvimento induzidos pelo efavirenz incluem antenas subdesenvolvidas, ausência e anormalidades do espinho caudal, severas alterações morfológicas da carapaça e interrupção do desenvolvimento embrionário (Figuras 23a-j).

Na Figura 24 evidencia-se a taxa de anormalidades devido à exposição de embriões com 96 horas em diversas concentrações de Efavirenz.

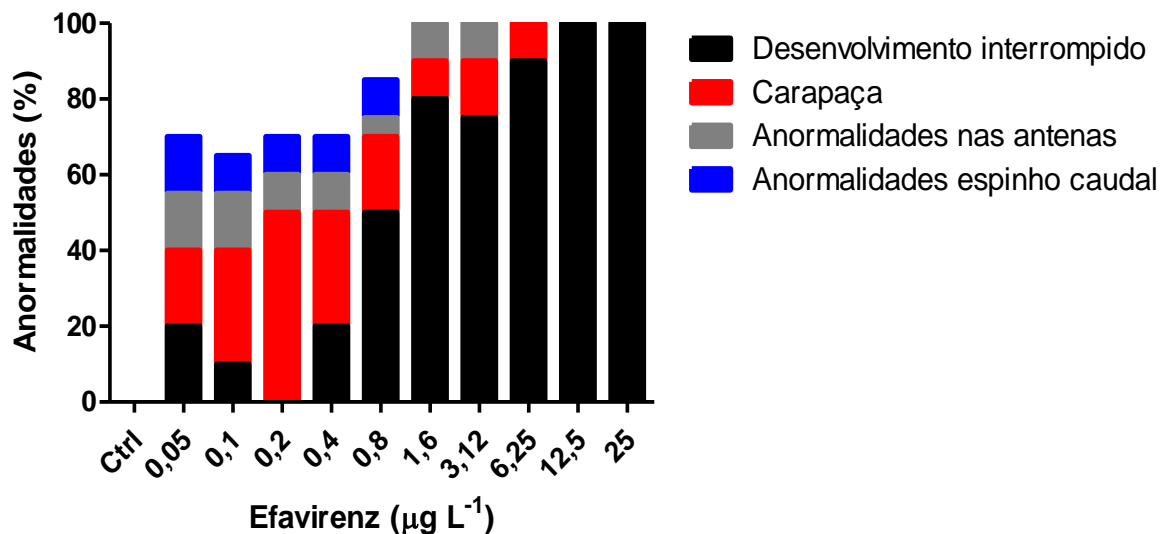
Figura 23 - Anomalias resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de efavirenz em 96 horas (a) controle, (b)  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , (c)  $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , (d)  $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ , (e)  $3,12 \mu\text{g L}^{-1}$ , (f)  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , (g)  $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , (h)  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , (i)  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , (j)  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$





Devido às baixas concentrações de diluição e a menor precisão das análises, o ensaio foi interrompido na concentração de  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nas concentrações de  $1,56$  a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ , nenhum organismo sobreviveu e 100% das daphnias apresentaram algum grau de malformação ou interrupção do desenvolvimento embrionário. Na concentração de  $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , 50% dos organismos tiveram seu desenvolvimento embrionário interrompido, 20% apresentaram anomalias na carapaça, 5% anormalidades das antenas e 10% no espinho caudal. Entre as concentrações  $0,05$  e  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ , no mínimo 60% dos organismos apresentaram anomalias o que evidencia que o EFV foi extremamente tóxico para os embriões de *D. similis*. Os efeitos das concentrações de EFV nos períodos de exposição foram registrados (Figura 24).

Figura 24 - Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de efavirenz.

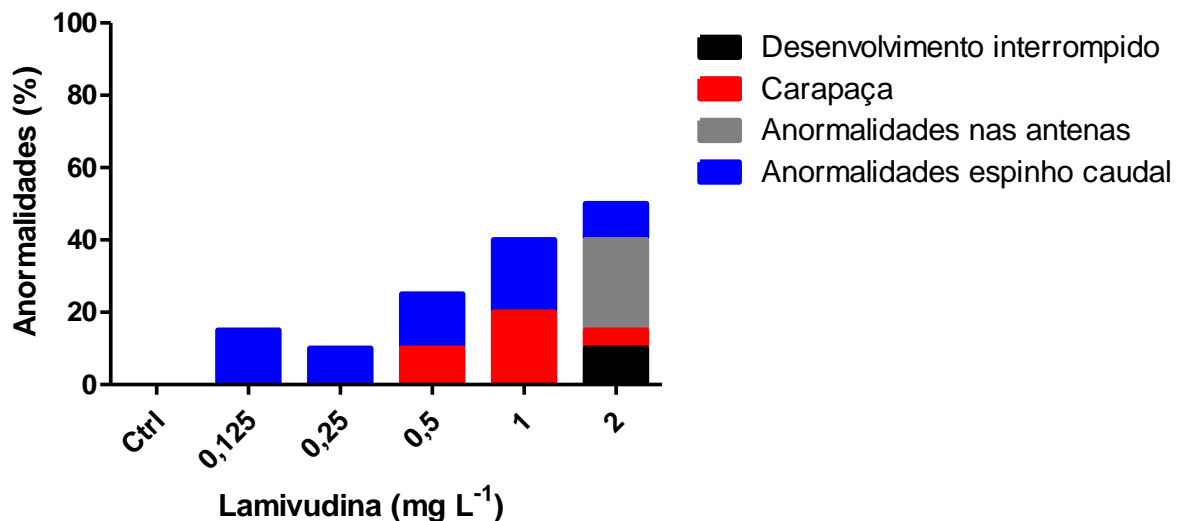


#### 4.6.3. Lamivudina

Os embriões de *D. similis* expostos *in vitro* a lamivudina revelaram embriotoxicidade em menor grau em comparação com os demais antivirais do estudo. Conforme evidenciado na Figura 25, os embriões de *Daphnia* expostos ao 3TC apresentaram algumas anomalias na carapaça, nas antenas, espinho caudal e interrupção da organogênese. Na concentração de  $2 \text{mg L}^{-1}$ : 25% dos organismos exibiram anomalias nas antenas, 10% apresentaram anormalidades no espinho

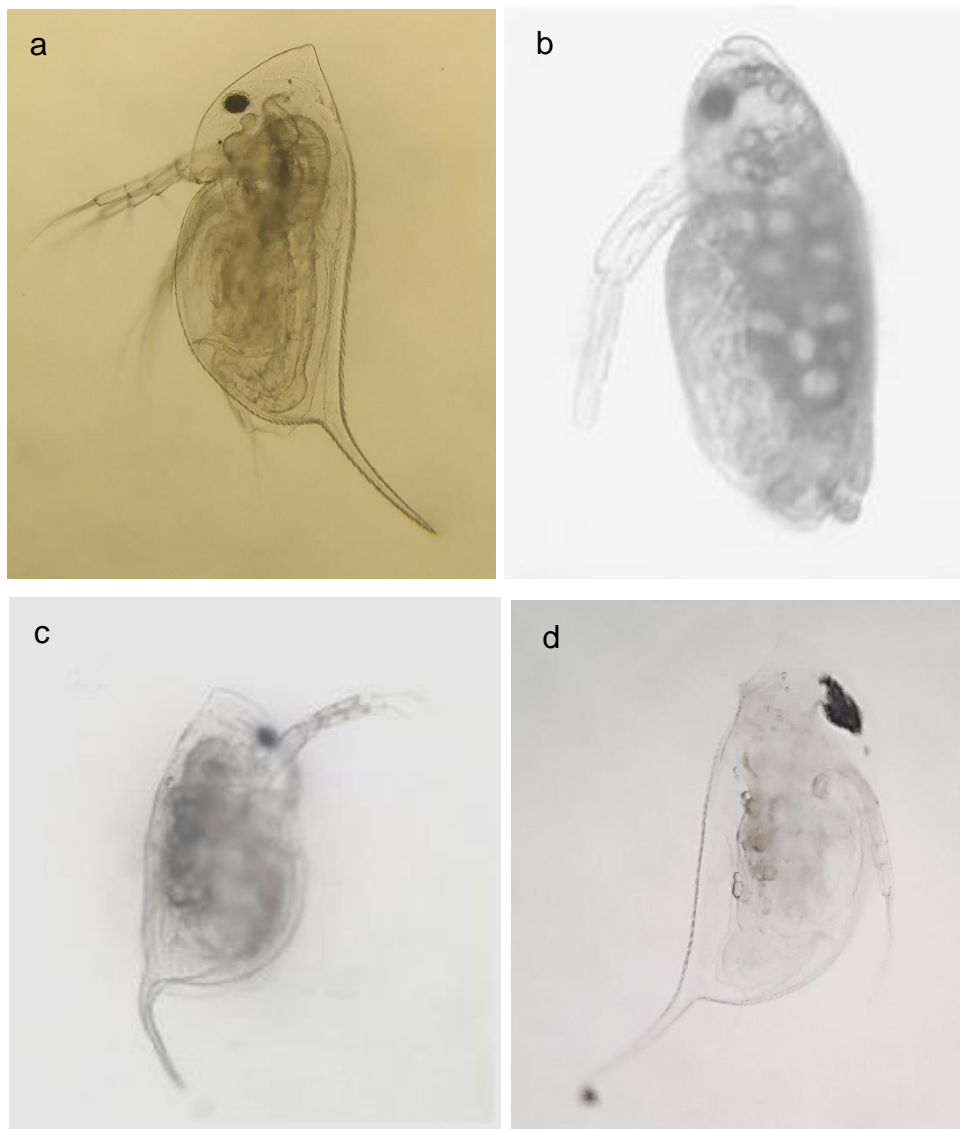
caudal e tiveram o seu desenvolvimento embrionário interrompido, enquanto que 5% anomalias na carapaça. 20% dos embriões exibiram anormalidades na carapaça e no espinho caudal na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>. Na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 15% dos embriões exibiram anormalidades no espinho caudal e 10% na carapaça; e na concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>, 15% apresentaram anormalidades no espinho caudal. As daphnias presentes nas concentrações 2 mg L<sup>-1</sup> e 1 mg L<sup>-1</sup> apresentaram um tamanho menor em comparação com as demais concentrações.

Figura 25 – Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de lamivudina.

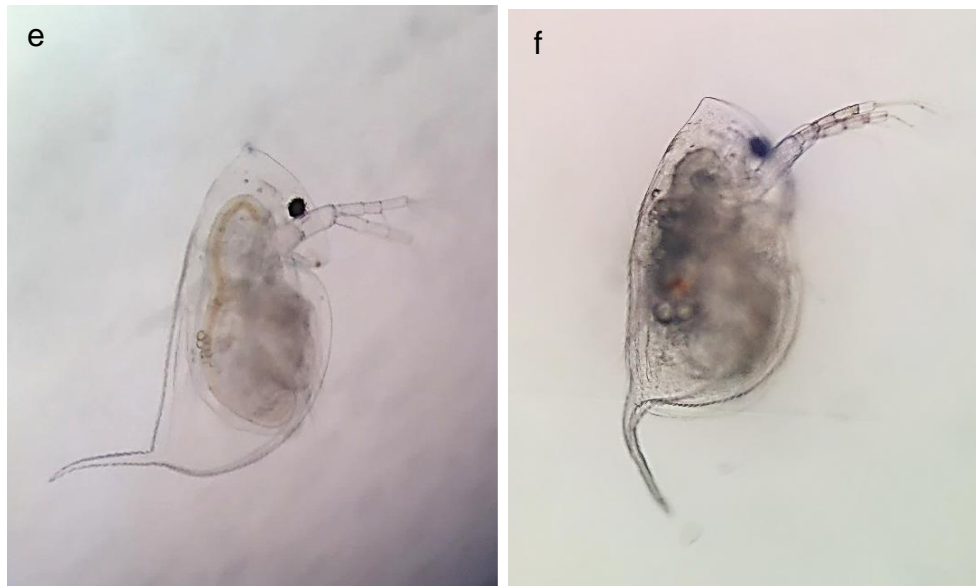


As evidências de anormalidades constadas nesse estudo com base na observação no microscópio óptico mostrou que a lamivudina nas concentrações de 2 a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> promoveu anomalias no desenvolvimento embrionário de *D. similis*, principalmente, no espinho caudal (Figura 26a-f).

Figura 26 - Desenvolvimento embrionário de *D. similis* exposta à lamivudina em 96 horas (a) controle, (b) 2 mg L<sup>-1</sup>, (c) 1 mg L<sup>-1</sup>, (d) 0,5 mg L<sup>-1</sup>, (e) 0,25 mg L<sup>-1</sup>, (f) 0,125 mg L<sup>-1</sup>





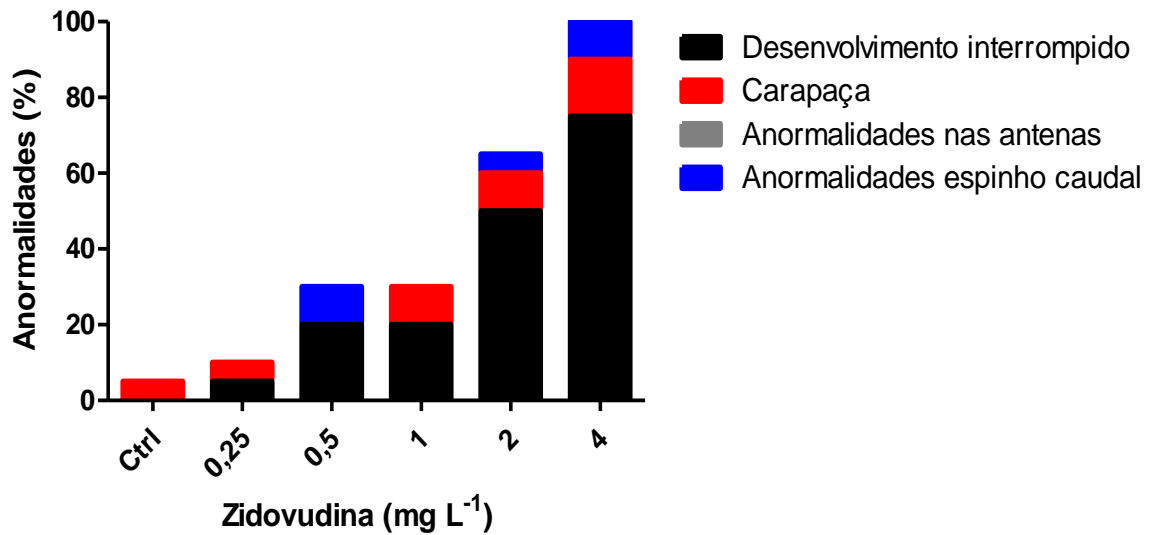


#### 4.6.4. Zidovudina

Em todas as 5 concentrações de AZT aconteceu a estagnação do desenvolvimento embrionário, provavelmente o mecanismo de ação do fármaco induziu a interrupção da organogênese. A Figura 27 apresenta as taxas de anormalidades resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de zidovudina.

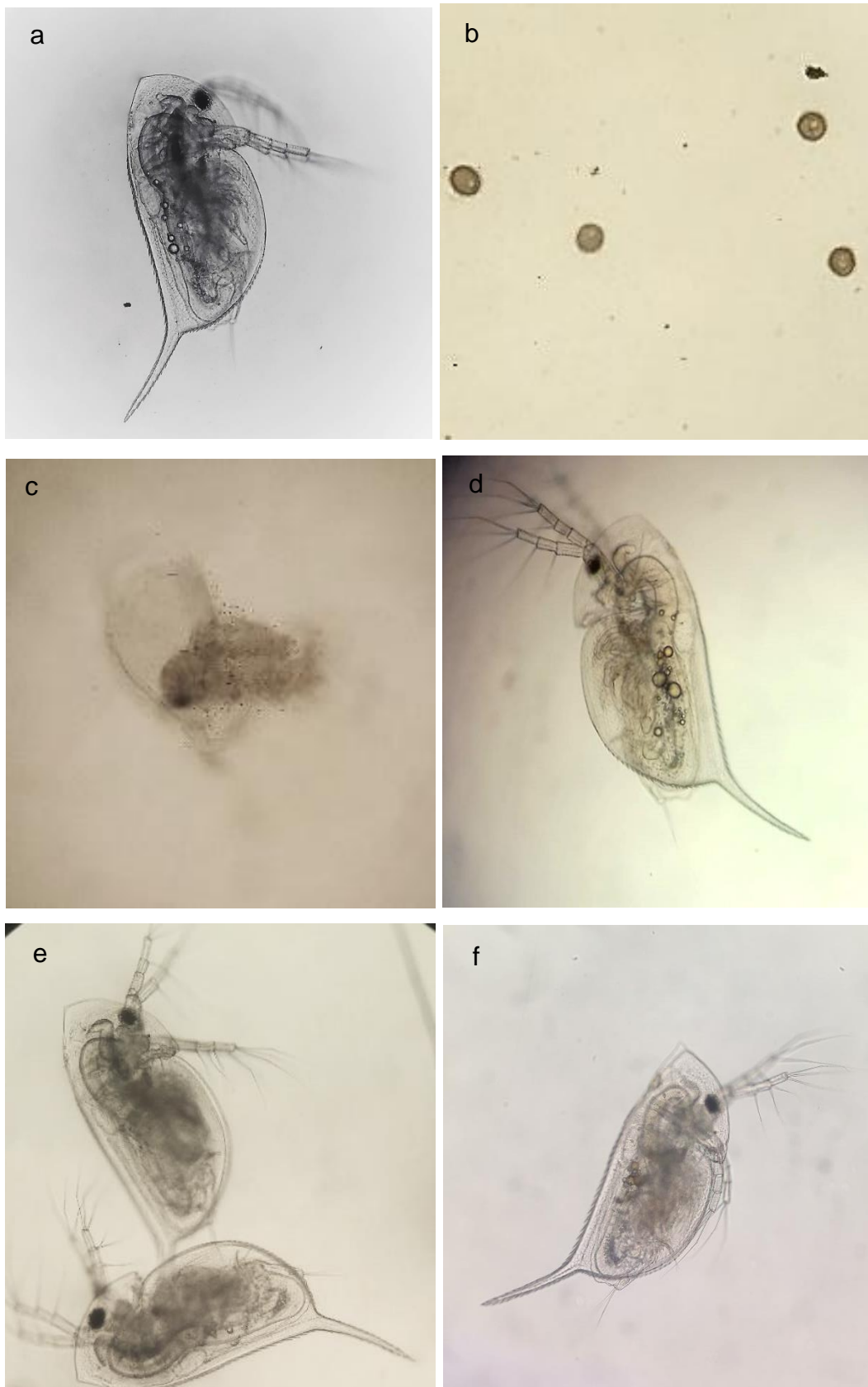
Conforme detalhado na Figura 27, a exposição ao AZT a  $4 \text{ mg L}^{-1}$  por 96 h induziu a cessação do desenvolvimento embrionário em 75% dos embriões; 15% dos embriões apresentaram anomalias na carapaça e 10 % dos organismos restantes exibiram anomalias no espinho caudal. Na concentração de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , 50% dos embriões tiveram o seu desenvolvimento estagnado, 10% anormalidades na carapaça e 5% espinho caudal anômalo. Nas concentrações de 1 e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , 4 dos 20 embriões utilizados (20%) apresentaram interrupção do desenvolvimento embrionário.

Figura 27 – Taxa de anormalidades resultantes da exposição de embriões de *D. similis* a concentrações de zidovudina.



Malformações foram registradas após o contato dos embriões com concentrações de AZT variando de 0,25 a 4 mg L<sup>-1</sup> (Figura 28a-f).

Figura 28 - Desenvolvimento embrionário de *D. similis* exposta à zidovudina em 96 horas (a) controle, (b) 4 mg L<sup>-1</sup>, (c) 2 mg L<sup>-1</sup>, (d) 1 mg L<sup>-1</sup>, (e) 0,5 mg L<sup>-1</sup>, (f) 0,25 mg L<sup>-1</sup>



O presente estudo é o primeiro a investigar os efeitos dos antivirais no desenvolvimento embrionário de *D. similis* até a presente data. Ensaio de toxicidade durante os estágios iniciais da vida de organismos aquáticos são conduzidos para determinar como os fatores alteram as trajetórias de desenvolvimento (MARTÍNEZ et al., 2021). A exposição a produtos químicos exógenos durante os estágios iniciais da vida de organismos aquáticos pode levar a mudanças estruturais significativas nos organismos que, em última análise, refletem o estado de saúde de um ecossistema (TRAVERSI et al., 2014). A técnica utilizada no presente estudo com *Daphnia* pode ser aplicada como um sistema de detecção de toxicidade no desenvolvimento de produtos químicos para organismos biologicamente importantes. Um protocolo com o método de ensaio foi elaborado para ser utilizado em trabalhos futuros (ver ANEXO 1).

O ensaio de embriotoxicidade com embriões de *Daphnia* pode ser usado para prever anomalias de outros organismos uma vez que o ciclo de vida é curto e seus estágios de desenvolvimento são identificados com um microscópio binocular simples (KHANGAROT e DAS, 2009). As *Daphnias* adultas reproduzem-se por partenogênese e estão disponíveis durante todo o ano, produzindo um grande número de embriões genotipicamente isogênicos a cada 3 dias sob condições laboratoriais favoráveis. Os estágios de desenvolvimento permitem a detecção de malformações morfológicas internas e externas. É essencialmente um teste de triagem embrio-teratogênico de baixo custo, que pode ser concluído em 72 a 96 horas (KHANGAROT e DAS, 2009; ZHANG et al., 2003).

Os resultados desta investigação fornecem evidências de que os testes ecotoxicológicos somados ao de embriotoxicidade, abrangendo todo o ciclo de vida dos organismos-teste podem ser uma ferramenta útil para determinar o mecanismo de ação pelo qual os poluentes promovem mudanças na população de *Daphnia* sp., bem como a estimativa de concentração ambiental segura de contaminantes.

Além disso, os resultados claramente demonstram que os antivirais são críticos para a embriogênese de *Daphnia*, sobretudo o efavirenz que é conhecido por ser teratogênico. Fêmeas de *Daphnia* produzem hormônios glicocorticoides como hidrocortisona, hormônio esse importante no desenvolvimento da carapaça (SMIRNOV, 2017). A concentração desse hormônio pode ser afetada devido à presença de EFV alterando a síntese de cortisol.

O efavirenz reduz os níveis de  $17\beta$ -estradiol (E2) no organismo, o que pode ser resultado da indução do metabolismo desses estrogênios (MCDONALD et al., 2018). De acordo com Väänänen e Härkönen (1996), E2 e outros estrogênios são importantes para o fechamento adequado das placas epifisárias durante o crescimento e desenvolvimento ósseo de organismos vertebrados. O estudo dos autores concluiu que o efavirenz causa anormalidades no desenvolvimento de vertebrados quando expostos em estágios iniciais da vida.

Nos resultados obtidos nessa pesquisa, foi observado que no ensaio com o fármaco lamivudina, as daphnias presentes nas concentrações  $2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram um tamanho menor em comparação com o controle, esse resultado corrobora com o estudo desenvolvido por A+ et al. (2013) que revelou que a administração de ARVs separadamente e em combinações tiveram potencial efeito embriotóxico demonstrado pelo retardo do crescimento significativo, evidenciado pela redução do peso ao nascer e do comprimento cabeça-nádega de ratos. Esse estudo visou estimar os efeitos embriotóxicos de ARVs no desenvolvimento fetal de ratos como modelo animal.

Alguns estudos foram dedicados a investigar a embriotoxicidade de poluentes perigosos em *Daphnia* (MU e LEBLANC, 2002; CUI et al., 2017; CHEN et al., 2018), mas não há até a presente data estudos sobre a embriotoxicidade de ARVs em cladóceros. O estudo conduzido pela autora corrobora com a observação de Wang et al., (2011) onde relata que diferentes fases da vida de um organismo têm distintas sensibilidades a produtos químicos tóxicos. A consideração de diferentes estágios de vida dentro da estrutura de avaliação de risco ambiental forneceria mais informações para proteger as espécies de contaminantes emergentes (BREITHOLTZ et al., 2006). Foi relatado que embriões de *Daphnia* sp. são mais sensíveis a alguns poluentes do que os estágios juvenil e adulto (ABE et al., 2001; CUI et al., 2017).

Djekoun et al. (2015) estimaram os efeitos do cádmio em embriões de *D. magna*. Os embriões expostos in vitro ao cádmio ( $60, 80$  e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) revelaram embriotoxicidade durante os diferentes estágios de desenvolvimento, com aparecimento de neonatos anormais de várias formas e tamanhos, com carapaça pouco desenvolvida e o desaparecimento de antenas. No presente estudo, a ocorrência de neonatos anômalos foi observada com os 4 antivirais, principalmente com o efavirenz.

Palma et al. (2008) avaliaram os efeitos promovidos pelo sulfato de endosulfan no ciclo de vida e desenvolvimento embrionário de *Daphnia magna*. Todas as concentrações testadas (9,2 a 458,7  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) apresentaram inúmeras anormalidades morfológicas no espinho caudal, na carapaça e desenvolvimento incompleto das antenas. Os dois pares de antenas das Daphnias auxiliam na sua locomoção, em “pequenos saltos” e são importantes na alimentação (EBERT, 2005). Neste estudo desenvolvido pela autora, a exposição dos embriões de *Daphnia* aos antivirais ACV, EFV e 3TC levaram a anormalidades no desenvolvimento das antenas.

Li et al. (2021) avaliaram a embriotoxicidade de *D. magna* utilizando ftalato de butil benzílico que é usado principalmente como plastificante para PVC. Os autores do estudo testaram as seguintes concentrações: 0,1; 0,6 e 1,2  $\text{mg L}^{-1}$  e em todas as concentrações observaram a anormalidades fenotípicas principalmente no espinho caudal. O espinho caudal de *Daphnia* serve como uma defesa mecânica, além de aumentar seu tamanho efetivo; o não desenvolvimento dos espinhos caudais levará acarretará danos à espécie, fazendo com que ela fique vulnerável à predação (DODDS; WHILES, 2020). Neste estudo, na maioria das concentrações testadas, o EFV gerou uma inibição do aparecimento do espinho caudal, o que para a espécie pode levar a um aumento da predação.

Efeitos de contaminantes ambientais como 4-nonilfenol (um desregulador endócrino), pesticidas, clorofenóis, anilinas, metais pesados, fungicidas e testosterona em embriões de *Daphnia* foram relatados em estudos anteriores (Tabela 17).

Os resultados desta investigação fornecem evidências de que os testes ecotoxicológicos somados ao de embriotoxicidade, abrangendo todo o ciclo de vida dos organismos-teste, podem ser uma ferramenta útil para determinar o mecanismo de ação pelo qual os poluentes promovem mudanças na população de *Daphnia* sp, bem como para a estimativa de concentração ambiental segura de contaminantes.

Tabela 17 - Efeitos de poluentes ambientais no desenvolvimento embrionário de *Daphnia* sp.

<b>Poluente</b>	<b>Concentrações testadas</b>	<b>Anormalidades observadas</b>	<b>Referência</b>
<b>Aciclovir</b>	0,125 – 2 mg L <sup>-1</sup>	Anormalidades no desenvolvimento	CUNHA, 2022
<b>Efavirenz</b>	0,05 – 25 µg L <sup>-1</sup>	Letalidade do embrião, inúmeras anomalias	CUNHA, 2022
<b>Lamivudina</b>	0,125 – 2 mg L <sup>-1</sup>	Anormalidades no desenvolvimento, tamanho reduzido	CUNHA, 2022
<b>Zidovudina</b>	0,25 – 4 mg L <sup>-1</sup>	Anormalidades no desenvolvimento	CUNHA, 2022
<b>4-Nonilfenol</b>	738 µg L <sup>-1</sup>	Letalidade do embrião	ZHANG et al., 2003
<b>4-Nonilfenol</b>	263 µg L <sup>-1</sup>	Espinho caudal curvado	ZHANG et al., 2003
<b>4-Nonilfenol</b>	44 µg L <sup>-1</sup>	Anormalidades no desenvolvimento	LEBLANC et al., 2000
<b>Carbaril (inseticida)</b>	1 – 5 µg L <sup>-1</sup>	Anormalidades no desenvolvimento e maturação tardia	KAST-HUTCHINSON et al.,
<b>Etilenotiureia</b>	20 mg L <sup>-1</sup>	Desenvolvimento interrompido	Ohta et al., 1998
<b>2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)</b>	0,1 – 1000 µg L <sup>-1</sup>	Desenvolvimento e reprodução afetada	Wu et al., 2001

<b>3,4-dicloroanilina (3,4-DCA)</b>	20 – 40 µg L <sup>-1</sup>	Desenvolvimento tardio e neonatos anormais	Sobral et al., 2001
<b>Dodecil benzeno sulfonato</b>	1,25 – 10 mg L <sup>-1</sup>	Embrião morreu sem desenvolvimento, o diâmetro do ovo diminuiu	Sobral et al., 2001
<b>Cádmio</b>	0,062 – 0,248 mg L <sup>-1</sup>	Desenvolvimento tardio	Sobral et al., 2001
<b>Cobre</b>	24 µg L <sup>-1</sup>	Letalidade dos embriões	Sobral et al., 2001
<b>Propiconazol (fungicida)</b>	0,015 – 0,25 mg L <sup>-1</sup>	Antena subdesenvolvida e anomalias na carapaça	Kast-Hutchinson et al., 2001
<b>Testosterona</b>	8 µM	Interrupção do desenvolvimento embrionário e anormalidades na carapaça	Mu e LeBlanc, 2002



## 5. CONCLUSÃO

A alga *R. subcapitata* respondeu à presença dos antivirais, o que foi demonstrado pelos efeitos de inibição em seu crescimento. A resposta da alga ao efavirenz foi mais intensa em comparação aos demais antivirais do estudo indicando que o EFV atua em organismos não-alvo. A *C. dubia* também foi afetada com a diminuição do número de neonatos, e o efavirenz também foi o antiviral mais tóxico. Em ambas as espécies, o AZT em concentrações menores estimulou as respostas dos organismos.

Dentre os antivirais estudados, foi possível confirmar que um dos antivirais mais usados em todo mundo, o efavirenz, é altamente perigoso para ambos os organismos com valores de  $CE_{50}$  de  $26 \mu\text{g L}^{-1}$  para *C. dubia* e  $CI_{50}$  de  $34 \mu\text{g L}^{-1}$  para *R. subcapitata*. Essa alta toxicidade se deve à presença de elementos químicos altamente reativos e à sua ação mitotóxica.

A avaliação de risco isolada dos antivirais identificou que o RQ do efavirenz e lamivudina para *C. dubia* e *R. subcapitata* excedeu 1, o que conferindo um alto risco ecológico, enquanto ACV e AZT isoladamente não causaria impactos diretamente significativos para algas e cladóceros devido à sua menor toxicidade. Com isso, sugere-se a necessidade de incluí-lo na lista de substâncias prioritárias para o monitoramento adequado do EFV apresentar risco significativo para os organismos aquáticos

O presente estudo determinou também que a abordagem de cálculo de  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$  é aplicável à avaliação de risco cumulativo de PFCEPs. A avaliação de risco cumulativa realizada identificou que os organismos aquáticos investigados estão potencialmente em risco aos efeitos combinados de antivirais. Os valores de  $RQ_{MEC/PNEC}$  e  $RQ_{STU}$  apresentaram valores de 229,43 e 222,54; respectivamente, indicando um alto risco e sinergismo desses antivirais em mistura.

O estudo também analisou os efeitos tóxicos de antivirais em embriões de *D. similis* e através dos resultados conclui-se que o efavirenz mostrou ser altamente embriotóxico induzindo anormalidades severas de desenvolvimento nos embriões, subdesenvolvimento das antenas e de anomalias do espinho caudal e após exposição em níveis baixos de  $\mu\text{g L}$ .

Por fim, com a realização dos ensaios de embriotoxicidade e os resultados analisados foi elaborado um protocolo do ensaio visando estabelecer uma padronização, sendo este um ensaio ainda pouco utilizado.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar a eficiência de Processos Oxidativos Avançados no tratamento de efluentes contendo os antivirais.
- Elaborar carta controle com substância de referência em solução aquosa para o ensaio de embriotoxicidade.

## 7. PUBLICAÇÕES

O estudo de toxicidade utilizando PFCPs propiciou a publicação de trabalhos significativos no grupo de pesquisa do LES e em parceria com o INT. O trabalho principal culminou com a publicação de um artigo na revista *Water and Science Tehnology*, classificada como A1 no Qualis das Engenharias I. Além do artigo, 6 trabalhos em Congressos (3 trabalhos completos e 3 resumos) foram publicados. Abaixo segue a lista com a enumeração dos trabalhos aceitos e publicados:

1. ALMEIDA, L. C.; MATTOS, A. C.; DINAMARCO, C. P. G.; FIGUEIREDO, N. G.; BILA, D. M. **Chronic toxicity and environmental risk assessment of antivirals in *Ceriodaphnia dubia* and *Raphidocelis subcapitata***. WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY, v. 84, p. 1623-1634, 2021. Qualis A1

Artigo principal da tese, abrangendo todos os ensaios de toxicidade crônica com os quatro antivirais.

2. Apresentação de pôster no XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia em Aracaju/2018:

➤ ALMEIDA, L. C.; FELIX, L. C.; DINAMARCO, C. P. G.; FIGUEIREDO, N. G.; BILA, D. M. **Estudo dos efeitos ecotoxicológicos do fármaco aciclovir em *raphidocelis subcapitata***.

➤ **Efeitos do triclosan no crescimento de microalgas *raphidocelis subcapitata*** (CAMILA PEREIRA GONSALEZ DINAMARCO, LUDMILA CUNHA DE ALMEIDA, LOUISE CRUZ FELIZ, GABRIELY PESSANHA DE ARAÚJO, DANIELE BILA)

3. Apresentação de trabalho completo no 18º Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SILUBESA) em Portugal/2018:

➤ **Inibidores seletivos da recaptção de serotonina: incidência no ambiente aquático, ecotoxicidade e ozonização para remoção** (CAMILA PEREIRA GONSALEZ DINAMARCO, STELLA MELGAÇO DE OLIVEIRA PINTO, LOUISE DA

CRUZ FELIX, LUDMILA CUNHA DE ALMEIDA, GABRIELLY PESSANHA DE ARAÚJO E DANIELE MAIA BILA)

4. Apresentação de trabalho completo no 19º Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SILUBESA), 2021:

➤ ALMEIDA, L. C.; MATTOS, A. C.; FIGUEIREDO, N. G.; BILA, D. M. **Antirretrovirais em ambientes aquáticos e águas residuais: estudo da ocorrência e toxicidade crônica.**

➤ ALMEIDA, L. C.; MATTOS, A. C.; FIGUEIREDO, N. G.; BILA, D. M. **Ensaio de embriotoxicidade no controle da poluição aquática por fármacos: efeitos do antirretroviral lamivudina.**

5. Apresentação de painel na 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, em Maceió/2022:

➤ MATTOS, A. C.; ROCHA, T. S.; CHIAPETTA, S. C.; SILVA, C. P.; FIGUEIREDO, N. G.; ALMEIDA, L. C., BILA. D.M. **Avaliação da toxicidade e desenvolvimento de método analítico para detecção e quantificação de antivirais em água.**

## REFERÊNCIAS

ABAFE, O. A.; SPÄTH, J.; FICK, J.; JANSSON, S.; BUCKLEY, C.; STARK, A.; PIETRUSCHKA, B.; MARTINCIGH, B. S. LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in influents and effluents from wastewater treatment plants in KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere*, v. 200, p. 660-670, 2018.

ABE, T.; SAITO, H.; NIIKURA, Y.; SHIGEOKA, T.; NAKANO, Y. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, v. 45, n. 4-5, p. 487-495, 2001.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic toxicology test methods. In: *Handbook of Ecotoxicology*, 2. ed. CRC Press, 2002. p. 43-68.

ADEOLA, A. O.; FORBES, P. B. Antiretroviral Drugs in African Surface Waters: Prevalence, Analysis, and Potential Remediation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 00, p. 1-16, 2021.

AFNOR – Association Française de Normalisation. Norme experimental T90-304. Essais dêseause. Determination de L`innibition de Scenedesmus subspicatus par une substance. AFNOR: 1980.

AL-KARAWI, D. H. The Investigation of The Electrical Control of Hemimicelles and Admicelles on Gold for Analyte Preconcentration. *Masters Theses & Specialist Projects*, 2016.

AMATO, E. D.; WADIGE, C. P. M.; TAYLOR, A. M.; MAHER, W. A.; SIMPSON, S. L.; JOLLEY, D. F. Field and laboratory evaluation of DGT for predicting metal bioaccumulation and toxicity in the freshwater bivalve *Hyridella australis* exposed to contaminated sediments. *Environmental Pollution*, v. 243, p. 862-871, 2018.

AMINOT, Y.; LITRICO, X.; CHAMBOLLE, M.; ARNAUD, C.; PARDON, P.; BUDZINDKI, H. Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 407, n. 28, p. 8585-8604, 2015.

ANDERSON, B. G. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*. *Sewage Works Journal*, p. 1156-1165, 1944.

AOKI, F. Y. Infecções virais. In: PAGE, C. P.; CURTIS, M. J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. *Farmacologia Integrada*. São Paulo: Manole, 1999. p. 445-460, 1999.

APOSTOLOVA, N.; BLAS-GARCIA, A.; GALINDO, M. J.; ESPLUGUES, J. V. Efavirenz: what is known about the cellular mechanisms responsible for its adverse effects. *European journal of pharmacology*, v. 812, p. 163-173, 2017.

AQUINO, S. F. D.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. D. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, p. 187-204, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 12648: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas. (Chlorophyceae), 2018.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 13373: Ecotoxicologia aquática—Toxicidade aguda—Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Cladocera, Crustacea), 2017.

AWODELE, O.; POPOOLA, T. D.; ODUNSI, P.; AKINDE, R.; AKINTONWA, A. Assessing the risk of birth defects associated with exposure to highly active anti-retroviral therapy during organogenesis in rats. *Tokai J Exp Clin Med*, v. 38, n. 2, p. 82-92, 2013.

AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VINHAS, T.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, v. 879, n. 1, p. 13-26, 2000.

AZUMA, T.; ARIMA, N.; TSUKADA, A.; HIRAMI, S.; MATSUOKA, R.; MORIWAKE, R.; ISHIUCHI, H.; INOYAMA, T.; TERANISHI, Y.; YAMAOKA, M.; MINO, Y.; HAYASHI, T.; FUJITA, Y.; MASADA, M. Detection of pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Science of the Total Environment*, v. 548, p. 189-197, 2016.

BABIĆ, S.; HORVAT, A. J.; PAVLOVIĆ, D. M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. Trends in *Analytical Chemistry*, v. 26, n. 11, p. 1043–1061, 2007.

BACKHAUS, T.; FAUST, M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environmental science & technology*, v. 46, n. 5, p. 2564-2573, 2012.

BACKHAUS, T.; KARLSSON, M. Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water research*, v. 49, p. 157-165, 2014.



BACKHAUS, T.; SCHOLZE, M.; GRIMME, L. H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic toxicology*, v. 49, n. 1-2, p. 49-61, 2000.

BANG, S. H.; AHN, J. -Y.; HONG, N. -H.; SEKHON, S. S.; KIM, Y. -H.; MIN, J., Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna* exposed to pharmaceuticals. *Molecular & Cellular Toxicology*, v. 11, p. 153-160, 2015.

BARAN, A.; TARNAWSKI, M. Assessment of heavy metals mobility and toxicity in contaminated sediments by sequential extraction and a battery of bioassays. *Ecotoxicology*, v. 24, n. 6, 1279-1293, 2015.

BASTOS, M.; COSTA, C. C. P.; BEZERRA, T. C.; DA SILVA, F. C.; BOECHAT, N. Efavirenz a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor of first-generation: approaches based on its medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 108, p. 455-465, 2016.

BAZIN, H.; CHATTOPADHYAYA, J.; DATEMA, R.; ERICSON, A. C.; GILLJAM, G.; JOHANSSON, N. G.; HANSEN, J.; KOSHIDA, R.; MOELLING, K.; DBERG, B.; RAMAUD, G.; STENING, G.; VRANG, L.; WAHREN, B.; WU, J-C. An analysis of the inhibition of replication of HOV and MULV by some 3'-blocked pyrimidine analogs. *Biochemical pharmacology*, v. 38, n.1, 109-119, 1989.

BLAS-GARCÍA, A.; APOSTOLOVA, N.; BALLESTEROS, D.; MONLEÓN, D.; MORALES, J. M.; ROCHA, M.; VICTOR, V. M.; ESPLUGUES, J. V. Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. *Hepatology*, v. 52, n. 1, p. 115-125, 2010.

BOPP, S. K.; BAROUKI, R.; BRACK, W.; DALLA COSTA, S.; DORNE, J. L. C.; DRAKVIK, P. E.; FAUST, M.; KARJALAINEN, T. K.; KEPHALOPOULOS, S.;

KLAVEREN, J.; KOLOSSA-GEHRING, M.; KORTENKAMP, A.; LEBRET, E.; LETTIERI, T.; RARAZONA, J. V.; TRIER, X. GILS, J. V.; BERGMAN, Å. Current EU research activities on combined exposure to multiple chemicals. *Environment International*, v. 120, p. 544-562, 2018.

BOWNIK, A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. *Science of the Total Environment*, v. 700, p. 134400, 2020.

BOYD, C. E. 2015 Nitrogen. In: *Water Quality*. Springer, Cham, pp. 223–241.

BRADLEY, P. M.; BARBER, L. B.; DURIS, J. W.; FOREMAN, W. T.; FURLONG, E. T.; HUBBARD, L. E.; HUTCHINSON, K. J.; KEEFE, S. H.; KOLPIN, D. W. Riverbank filtration potential of pharmaceuticals in a wastewater-impacted stream. *Environmental pollution*, v. 193, p. 173-180, 2014.

BRANDARIZ-NUÑEZ, D.; CORREAS-SANAHUJA, M.; MAYA-GALLEGO, S.; MARTÍN HERRANZ, I. Neurotoxicity associated with acyclovir and valacyclovir: A systematic review of cases. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 46, p. 918–926, 2021.

BREITHOLTZ, M.; RUDÉN, C.; HANSSON, S. O.; BENGTSSON, B. E. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 63, n. 2, p. 324-335, 2006.

BREZOVSEK, P.; ELERSEK, T. METKA FILIPI, M. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Research*, v. 52, p. 168-177, 2014.

BRUNTON, L. L.; KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13*. Artmed Editora, 2018.

BRYAN-MARRUGO, O. L.; RAMOS-JIMÉNEZ, J.; BARRERA-SALDAÑA, H.; ROJAS-MARTÍNEZ, A.; VIDALTAMAYO, R.; RIVAS-ESTILLA, A. M. History and progress of antiviral drugs: from acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina universitaria*, v. 17, n. 68, p. 165-174, 2015.

BUXTON, I. AND BENET, L. (2011) Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, metabolism and elimination. In: BRUNTON, L., CHABNER, B. AND KNOLLMANN, B. (eds), Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill, pp. 17–40.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A.; HOLLAND, C. D. Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Analysis*, v. 19, p. 261–281, 1999.

CALVO-FLORES, F. G.; ISAC-GARCÍA, J., JIMÉNEZ, J. A. D.; DOBADO, J. A. *Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties*. John Wiley & Sons. 2018.

CARUSSO, S.; JUÁREZ, A. B.; MORETTON, J.; MAGDALENO, A. Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green alga species. *Chemosphere*, v. 194, p. 821-827, 2018.

CESCHIN, S.; BELLINI, A.; SCALICI, M. Aquatic plants and ecotoxicological assessment in freshwater ecosystems: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 5, p. 4975-4988, 2021.

CHEMAXON. ChemAxon – Software Solutions and Services for Chemistry and Biology (Version 16.10. 31). Disponível em: <http://www.chemaxon.com> (acessado em 23 de novembro de 2020).

CHEN, K. F.; HUANG, S. Y.; CHUNG, Y. T.; WANG, K. S.; WANG, C. K.; CHANG, S. H. Detoxification of nicotine solution using Fe<sup>0</sup>-based processes: Toxicity evaluation by

*Daphnia magna* neonate and embryo assays. *Chemical Engineering Journal*, v. 331, p. 636-643, 2018.

COMMISSION IMPLEMENTING DECISION (EU). 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) N° 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II. Environmental Risk Assessment, Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg, 2003.

CRANE, M.; HANDY, R. D.; GARROD, J.; OWEN, R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 421-437, 2008.

CUI, F.; CHAI, T.; QIAN, L.; WANG, C. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 169, p. 107-116, 2017.

CUNNINGHAM, A.; GRIFFITHS, P.; LEONE, P.; MINDEL, A.; PATEL, R.; STANBERRY, L.; WHITLEY, R. Current management and recommendations for access to antiviral therapy of herpes labialis. *Journal of clinical virology*, v. 53, n. 1, p. 6-11, 2012.

D'ANDREA, G.; BRISDELLI, F.; BOZZI, A. AZT: an old drug with new perspectives. *Current Clinical Pharmacology*, v. 3, n. 1, p. 20-37, 2008.

DANIELS, K. D.; PARK, M.; HUANG, Z.; JIA, A.; FLORES, G. S.; LEE, H. K.; SNYDER, S. A. A review of extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in environmental

waters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 50, n. 21, p. 2271-2299, 2020.

DAOUK, S.; CHEVRE, N.; VERNAZ, N.; BONNABRY, P.; DAYER, P.; DAALI, Y.; FLEURY-SOUVERAIN, S. Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. *Journal of environmental management*, v. 160, p. 324-332, 2015.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International journal of antimicrobial agents*, v. 33, n. 4, p. 307-320, 2009.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 1, p. 13-25, 2002.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 214, p. 442-448, 2011.

DEEKS, S. G.; LEWIN, S. R.; HAVLIR, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet*, v. 382, p.1525-1533, 2013.

DIETRICH, S.; PLOESSL, F.; BRACHER, F.; LAFORSCH, C. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*-a multigenerational study. *Chemosphere*, v. 79, n. 1, p. 60-66, 2010.

DJEKOUN, M.; BENSOLTANE, S.; BOURECHROUCHE, A.; BOURECHROUCHE, M.; BERREBAH, H. In-vitro toxicity of cadmium on the development of parthenogenetic eggs of a freshwater cladoceran: *Daphnia magna*. *Journal of Materials and Environmental Science*, v. 6, p.957-962, 2015.

DODDS W. K.; WHILES, M. R. Predation and foods Webs. In: *Freshwater Ecology*, 3 ed., p. 621–651, Academic Press, 2020.

DRUGBANK. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/>. Acessado em 15 de outubro de 2018.

DUAN, L.; ZHANG, Y.; WANG, B.; CAGNETTA, G.; DENG, S.; HUANG, J.; WANG, Y.; YU, G. Characteristics of pharmaceutically active compounds in surface water in Beijing, China: Occurrence, spatial distribution and biennial variation from 2013 to 2017. *Environmental Pollution*, v. 264, p. 114753. 2020.

EBERT, D. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia*. National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, 2005.

EDWARDS, Q. A.; SULTANA, T.; KULIKOV, S. M.; GARNER-O'NEALE, L. D.; YARGEAU, V.; METCALFE, C. D. Contaminants of emerging concern in wastewaters in Barbados, West Indies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 101, n. 1, p. 1-6, 2018.

ENGLERT, B. Method 1694: pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by CLAE/MS/MS. *US Environmental Protection Agency (EPA). TECHNOLOGY, OOSA*, p. 1-72, 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, EMEA/CHMP/ SWP/4447/00. In: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2006.

EVANS, J. S.; LOCK, K. P.; LEVINE, B. A.; CHAMPNESS, J. N.; SANDERSON, M. R.; SUMMERS, W. C.; MCLEISH, P. J.; BUCHAN, A. Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2083-2092, 1998.

FARIA, L. J. S. *Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia*. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial), Unicamp, Campinas, 2004.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122-159, 2006.

FISHER, I. J.; PHILLIPS, P. J.; COLELLA, K. M.; FISHER, S. C.; TAGLIAFERRI, T.; FOREMAN, W. T.; FURLONG, E. T. The impact of onsite wastewater disposal systems on groundwater in areas inundated by Hurricane Sandy in New York and New Jersey. *Marine pollution bulletin*, v. 107, n. 2, p. 509-517, 2016.

FRANCHI, L. P.; PENTIADO, N. H. G. R.; DO NASCIMENTO SILVA, R.; GUIMARÃES, N. N.; JESUINO, R. S. A.; DE ANDRADE, H. H. R.; LEHMANN, M.; CUNHA, K. S. Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and chemical toxicology*, v. 47, n. 3, 578-582, 2009.

FUNES, H. A.; APOSTOLOVA, N.; ALEGRE, F.; BLAS-GARCIA, A.; ALVAREZ, A.; MARTI-CABRERA, M.; ESPLUGUES, J. V. Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: a clue to understanding the central nervous system side effects of efavirenz. *The Journal of infectious diseases*, v. 210, n. 9, p. 1385-1395, 2014.

FUNKE, J.; PRASSE, C.; TERNES, T. A. Identification of transformation products of antiviral drugs formed during biological wastewater treatment and their occurrence in the urban water cycle. *Water research*, v. 98, p. 75-83, 2016.

FURLONG, E. T.; BATT, A. L.; GLASSMEYER, S. T.; NORIEGA, M. C.; KOLPIN, D. W.; MASH, H.; SCHENCK, K. M. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States: Pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, v. 579, n. 1629-1642, 2017.

GALASSO, G. J.; BOUCHER, C. A. B.; COOPER, D. A.; KATZENSTEIN, D. A. *Practical Guidelines in Antiviral Therapy*, 1.<sup>st</sup> Edition, Netherlands: Elsevier Science B.V., Netherlands 2002.

GALBRAITH, A.; BULLOCK, S.; MANIAS, S.; HUNT, B.; RICHARDS, A. (2004) Pharmacokinetics: absorption and distribution. In: *Fundamentals of Pharmacology: A Text for Nurses and Health Professionals.*, England: 4th Ed. Pearson Education Limited, 2004. Essex, England, p.p 109–114.

GARCIA-CANTON, C., ANADON, A. & MEREDITH, C. Assessment of the in vitro  $\gamma$ H2AX assay by high content screening as a novel genotoxicity test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 757 (2), 158–166, 2013.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DE ZEE, S. E. A.; RITSEMA, C. J. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. *International soil and water conservation research*, v. 3, n.1, p. 57-65, 2015.

GIGER, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 393, n.1, p. 37-44, 2009.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F. What do we know about the ecotoxicology of pharmaceutical and personal care product mixtures? A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 16, p. 1453-1496, 2017.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. A. Z. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment – a review. *Chemosphere*, v. 138, p. 281-291, 2015.



GROB, R. L.; BARRY, E. F. *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons, 2004.

HERNÁNDEZ, A. F.; TSATSAKIS, A. M. Human exposure to chemical mixtures: challenges for the integration of toxicology with epidemiology data in risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 103, p. 188-193, 2017.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; BARCELÓ, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, v. 69, n. 2, p. 334-342, 2006.

HORN, S.; VOGT, T.; GERBER, E.; VOGT, B.; BOUWMAN, H.; PIETERS, R. HIV-antiretrovirals in river water from Gauteng, South Africa: Mixed messages of wastewater inflows as source. *Science of The Total Environment*, v. 806, p. 150346, 2022.

JAIN, S.; KUMAR, P.; VYAS, R. K.; PANDIT, P.; DALAI, A. K. Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. *Water Air and Soil Pollution*, v. 224, n. 1410, p. 1-19, 2013.

JOHNSON, M. A.; MOORE, K. H. P.; YUEN, G. J.; BYE, A.; PAKES, G. E. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. *Clinical. Pharmacokinetics.*, v. 36, n. 1, p. 41-66, 1999.

KÄLLQVIST, T.; MILAČIČ, R.; SMITAL, T.; THOMAS, K. V.; VRANES, S.; TOLLEFSEN, K. E. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water research*, v. 42, n. 8-9, p. 2146-2156, 2008.

KANDIE, F. J.; KRAUSS, M.; BECKERS, L. M.; MASSEI, R.; FILLINGER, U.; BECKER, J.; LIESS, M.; TORTO, B.; BRACK, W. Occurrence and risk assessment of organic micropollutants in freshwater systems within the Lake Victoria South Basin, Kenya. *Science of The Total Environment*, v. 714, p. 136748, 2020.

KAST-HUTCHESON, K.; RIDER, C. V.; LEBLANC, G. A. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 20, n. 3, p. 502-509, 2001.

KAUR, G.; SHARMA, S. Gas Chromatography – A Brief Review. *International journal of information and computing Science*, v. 5, n. 7, 2018.

KERR, S. G.; ANDERSON, K. S. Pre-steady-state kinetic characterization of wild type and 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) resistant human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: implication of RNA directed DNA polymerization in the mechanism of AZT resistance. *Biochemistry*, v. 36, n. 46, p. 14064-14070, 1997.

KHANGAROT, B. S.; DAS, S. Toxicity of mercury on in vitro development of parthenogenetic eggs of a freshwater cladoceran *Daphnia carinata*. *Journal of hazardous materials*, v. 161, n. 1, p. 68-73, 2009.

KIM, H.; HOMAN, M. Evaluation of pharmaceuticals and personal care products (PFCPs) in drinking water originating from Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research*, v. 46, n. 5, p. 1321-1330, 2020.

KONSTAS, P. S.; KOSMA, C.; KONSTANTINOOU, I.; ALBANIS, T. Photocatalytic treatment of pharmaceuticals in real hospital wastewaters for effluent quality amelioration. *Water*, v. 11, n. 10, p. 2165, 2019.

K'OREJE, K. O.; KANDIE, F. J.; VERGEYNST, L.; ABIRA, M. A.; VAN LANGENHOVE, H.; OKOTH, M.; DEMEESTERE, K. Occurrence, fate and removal of pharmaceuticals, personal care products and pesticides in wastewater stabilization ponds and receiving rivers in the Nzoia Basin, Kenya. *Science of the Total Environment*, v. 637, p. 336-348, 2018.

K'OREJE, K.O.; VERGEYNST, L.; OMBAKA, D.; DE WISPELAERE, P.; OKOTH, M.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere*, v. 149, p. 238-244, 2016.

KOSMA, C. I.; KAPSI, M. G.; KONSTAS, P. S. G.; TRANTOPOULOS, E. P.; BOTI, V. I.; KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A. Assessment of multiclass pharmaceutical active compounds (PhACs) in hospital WWTP influent and effluent samples by UCLAE-Orbitrap MS: Temporal variation, removals and environmental risk assessment. *Environmental research*, v. 191, p. 110152, 2020.

KUDU, I.; PILLAY, V.; MOODLEY, B. Antiretrovirals (ARVs) in the environment. *Emerging Freshwater Pollutants*, p. 227-239, 2022.

KÜMMERER, K. Pharmaceuticals in the environment– a brief summary. In: *Pharmaceuticals in the Environment*. Berlin: Springer, p. 3-21, 2008.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *The Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 2354-2366, 2009.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, v. 163, p. 287-303, 2012.

LEBLANC, G. A.; MU, X.; RIDER, C. V. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental health perspectives*, v. 108, n. 12, p. 1133-1138, 2000.

LEBLANC, G. *Basic of Environmental Toxicology. A Textbook of Modern Toxicology*. E. Hodgson. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

LETSINGER, S.; KAY, P.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; VILLAGRASSA, M.; BARCELÓ, D.; ROTCHELL, J. M. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals in UK estuaries. *Science of the Total Environment*, v. 678, p. 74-84, 2019.

LI, J.; LI, H.; LIN, D.; LI, M.; WANG, Q.; XIE, S.; ZHANG, Y.; LIU, F. Effects of butyl benzyl phthalate exposure on *Daphnia magna* growth, reproduction, embryonic development and transcriptomic responses. *Journal of Hazardous Materials*, v. 404, p. 124030, 2021.

LIŠKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis—historical development and overview. *Journal of Chromatography A*, v. 885, n. 1-2, p. 3-16, 2000.

LIU, H.; YU, H.; GIESY, J. P.; SUN, Y.; WANG, X. Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, v. 66, n. 11, p. 2159-2165, 2007.

LUJA-MONDRAGÓN, M.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; SANJUAN-REYES, N.; ISLAS-FLORES, H.; OROZCO-HERNÁNDEZ, J. M.; HEREDIA-GARCÍA, G.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; DUBLÁN-GARCÍA, O. Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of the total environment*, v. 660, p. 751-764, 2019.

MARRÓ, A. V. Z = 9, flúor, F. Elemento más oxidante que el oxígeno. *Anales de Química de la RSEQ*, v. 115, n. 2, p. 71-71, 2019.

MARTÍNEZ, G.; PEÑA, E.; MARTÍNEZ, R.; CAMARILLO, S.; BURGGREN, W.; ÁLVAREZ, A. Survival, growth, and development in the early stages of the tropical gar *Atractosteus tropicus*: developmental critical windows and the influence of temperature, salinity, and oxygen availability. *Fishes*, v. 6, n. 1, p. 5, 2021.

MASCOLO, G.; LAERA, G.; POLLICE, A.; CASSANO, D.; PINTO, A.; SALERNO, C.; LOPEZ, A. Effective organics degradation from pharmaceutical wastewater by an

integrated process including membrane bioreactor and ozonation. *Chemosphere*, v. 78, n. 9, p. 1100-1109, 2010.

MASONER, J. R.; KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; COZZARELLI, I. M.; GRAY, J. L.; SCHWAB, E. A. Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the conterminous United States. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 10, p. 2335-2354, 2014.

MCCURRY, D. L.; BEAR, S. E.; BAE, J.; SEDLAK, D. L.; MCCARTY, P. L.; MITCH, W. A. Superior removal of disinfection byproduct precursors and pharmaceuticals from wastewater in a staged anaerobic fluidized membrane bioreactor compared to activated sludge. *Environmental Science & Technology Letters*, v. 1, n. 11, p. 459-464, 2014.

MCDONALD, C. R.; CONROY, A. L.; GAMBLE, J. L.; PAPP, E.; HAWKES, M.; OLWOCH, P.; NATUREEBA, P.; KAMYA, M.; SILVERMAN, M.; COHAN, D.; KOSS, C. A.; DORSEY, G.; KAIN, K. C.; SERGHIDES, L. Estradiol levels are altered in human immunodeficiency virus–infected pregnant women randomized to efavirenz-versus lopinavir/ritonavir-based antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 3, 428-436, 2018.

MELVIN, S. D.; LEUSCH, F. D. L. Removal of trace organic contaminants from domestic wastewater: A meta-analysis comparison of sewage treatment technologies. *Environment international*, v. 92, p. 183-188, 2016.

MHUKA, V.; DUBE, S.; NINDI, M. M. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PFCPs) in wastewater and receiving waters in South Africa using LC-Orbitrap™ MS. *Emerging Contaminants*, v. 6, p. 250-258, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Boletim epidemiológico – HIV AIDS*, v. 49, n. 53, 2018.

MLUNGUZA, N. Y.; NCUBE, S.; MAHLAMBI, P. N.; CHIMUKA, L.; MADIKIZELA, L. M. Determination of selected antiretroviral drugs in wastewater, surface water and aquatic plants using hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of hazardous materials*, v. 382, p. 121067, 2020.

MOHAPATRA, S.; HUANG, C.H.; MUKHERJI, S.; PADHYE, L.P. Occurrence and fate of pharmaceuticals in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States. *Chemosphere*, v. 159, p. 526-535, 2016.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, v. 35, n. 5, p. 803-814, 2009.

MOORE, K. H. P; BARRETT, J. E.; SHAW, S.; PAKES, G. E.; CHURCHUS, R.; KAPPOR, A.; LLOYD, J.; BARRY, M. G; BACK, D. The pharmacokinetics of lamivudine phosphorylation in peripheral blood mononuclear cells from patients infected HIV-1. *AIDS*, v. 13, n. 16, p. 2239-2250, 1999.

MOREIRA, D. S. Desenvolvimento de Metodologia Analítica por Cromatografia/Espectrofotometria de massas para Avaliação da Ocorrência de Pertubadores Endócrinos em Mananciais de Abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. *Revista de nutrição*, v. 15, n. 2, p. 223-238, 2002.

MTOLO, S. P.; MAHLAMBI, P. N.; MADIKIZELA, L. M. Synthesis and application of a molecularly imprinted polymer in selective solid-phase extraction of efavirenz from water. *Water Science and Technology*, v. 79, n. 2, 356-365, 2019.

MU, X.; LEBLANC, G. A. Environmental antiandrogens alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 292, n. 3, p. 287-292, 2002.

NAG, R.; O'ROURKE, S. M.; CUMMINS, E. Risk factors and assessment strategies for the evaluation of human or environmental risk from metal (loid) s—A focus on Ireland. *Science of the Total Environment*, v. 802, p. 149839, 2022.

NAGATO, E. G.; SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. Metabolomics reveals energetic impairments in *Daphnia magna* exposed to diazinon, malathion and bisphenol-A. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 175-186, 2016.

NANNOU, C.; OFRYDOPOULOU, A.; EVGENIDOU, E.; HEATH, D.; HEATH, E.; LAMBROPOULOU, D. Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity. *Science of The Total Environment*, v. 699, p. 134322, 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *A framework to guide selection of chemical alternatives*. National Academies Press, 2014.

NCUBE, S.; MADIKIZELA, L. M.; CHIMUKA, L.; NINDI, M. M. Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. *Water research*, v. 145, p. 231-247, 2018.

NGUMBA, E.; GACHANJA, A.; NYIRENDA, J.; MALDONADO, J.; TUHKANEN, T. Occurrence of antibiotics and antiretroviral drugs in source-separated urine, groundwater, surface water and wastewater in the peri-urban area of Chunga in Lusaka, Zambia. *Water SA*, v. 46, n. 2, p. 278-284, 2020.

NGUMBA, E.; GACHANJA, A.; TUHKANEN, T. Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. *Science of the Total Environment*, v. 539, p. 206-213, 2016a.

NGUMBA, E.; KOSUNEN, P.; GACHANJA, A.; TUHKANEN, T. A multiresidue analytical method for trace level determination of antibiotics and antiretroviral drugs in wastewater and surface water using SPE-LC-MS/MS and matrix-matched standards. *Analytical methods*, v. 8, n. 37, p. 6720-6729, 2016b.

NORMAN NETWORK. List of emerging substances. 2016. Disponível em [http://www.normannetwork.net/sites/default/files/files/Emerging\\_substances\\_list\\_Feb\\_16/NORMAN\\_list\\_2016\\_FINAL.XLSX](http://www.normannetwork.net/sites/default/files/files/Emerging_substances_list_Feb_16/NORMAN_list_2016_FINAL.XLSX). Acessado em: 10 de abril de 2020.

OECD, Organization for Economic Co-operations and Development, 2002. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; DOS SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *INSULA Revista de Botânica*, v. 36, p. 39-74, 2007.

OHTA, T.; TOKISHITA, S.; SHIGA, Y.; HANAZATO, T.; YAMAGATA, H. An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: Malformation induced by ethylenethiourea. *Environmental Research*, v. 77, p. 43-48, 1998.

OMOTOLA, E. O.; GENTHE, B.; NDLELA, L.; OLATUNJI, O. S. Environmental Risk Characterization of an Antiretroviral (ARV) Lamivudine in Ecosystems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 16, p. 8358, 2021.



ONWUAMAH, C. K.; EKAMA, S. O.; AUDU, R. A.; EZECHI, O. C.; POIRIER, M. C.; ODEIGAH, P. G. C. Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. *PloS One*, v. 9, n. 3, p. e90296, 2014.

PALMA, P.; PALMA, V. L.; FERNANDES, R. M.; SOARES, A. M. V. M.; BARBOSA, I. R. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 2, p. 344-350, 2009.

PALMIOTTO, M.; CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; MANENTI, A.; RIVA, F.; DAVOLI, E. Personal care products in surface, ground and wastewater of a complex aquifer system, a potential planning tool for contemporary urban settings. *Journal of environmental management*, v. 214, p. 76-85, 2018.

PANNERSELVAM, A. M.; KULANTHAIVELU, J.; MOHAN, K. R.; GOPINATH, A. Herpes Zoster in Four HIV Seropositive Patients and One Patient With Recurrent Carcinoma After Radiotherapy. *Cureus*, v. 14, n. 2, p. e21922, 2022.

PAPAGEORGIU, M.; KOSMA, C.; LAMBROPOULOU, D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Science of the total Environment*, v. 543, p. 547-569, 2016.

PENG, X.; WANG, C.; ZHANG, K.; WANG, Z.; HUANG, Q.; YU, Y.; OU, W. Profile and behavior of antiviral drugs in aquatic environments of the Pearl River Delta, China. *Science of the Total Environment*, v. 466, p. 755-761, 2014.

PEPPER, I.; GERBA, C. E.; BRUSSEAU, M. *Pollution Science*. 1. Ed. San Diego: Academic Press, 1996.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PETERSEN, K.; STENRØD, M.; TOLLEFSEN, K. Initial environmental risk assessment of combined effects of plant protection products in six different areas in Norway. Norwegian Institute for Water Research, 2013.

PETRIE, B.; YODAN, J.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1431, p. 64-78, 2016.

PORTILLA, D.; SCHNACKENBERG, L.; BEGER, R. D. Metabolomics as an extension of proteomic analysis: study of acute kidney injury. In: *Seminars in nephrology*. WB Saunders, 2007. p. 609-620.

PRASSE C.; SCHLÜSENER, M. P.; SCHULZ, R.; TERNES, T. A. Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 5, p. 1728-1735, 2010.

PRASSE, C.; WAGNER, M.; SCHULZ, R.; TERNES, T. A. Biotransformation of the antiviral drugs acyclovir and penciclovir in activated sludge treatment. *Environmental science & technology*, v. 45, n. 7, p. 2761-2769, 2011.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. 2 ed., Taylor & Francis, 1995.

RATTE, H. T.; HAMMERS-WIRTZ, M.; CLEUVERS, M. Ecotoxicity testing. In: *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. Elsevier, 2003. p. 221-256.

RIMAYI, C.; ODUSANYA, D.; WEISS, J. M.; DE BOER, J.; CHIMUKA, L. Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the uMngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa. *Science of the Total Environment*, v. 627, p. 1008-1017, 2018.

RIST, S.; HARTMANN, N. B. Aquatic ecotoxicity of microplastics and nanoplastics: lessons learned from engineered nanomaterials. In: *Freshwater Microplastics*. Springer, Cham, 2018. p. 25-49.

ROBSON, L.; BARNHOORN, I. E. J.; WAGENAAR, G. M. The potential effects of efavirenz on *Oreochromis mossambicus* after acute exposure. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 56, p. 225-232, 2017.

RUPPERT, E. E; FOX, R.F.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005.

SANDERMANN, H. Molecular ecotoxicology of plants. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 8, p. 406-413, 2004.

SARAFIANOS, S. G.; MARCHAND, B.; DAS, K.; HIMMEL, D. M.; PARNIAK, M. A.; HUGHES, S. H.; ARNOLD, E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of molecular biology*, v. 385, n. 3, p. 693-713, 2009.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*, v. 8, p. 15, 2014.

SCHOEMAN, C.; DLAMINI, M.; OKONKWO, O. J. The impact of a wastewater treatment works in Southern Gauteng, South Africa on efavirenz and nevirapine discharges into the aquatic environment. *Emerging Contaminants*, v. 3, n. 2, p. 95-106, 2017.

SCHOEMAN, C.; MASHIANE, M.; DLAMINI, M.; OKONKWO, O. J. Quantification of selected antiretroviral drugs in a wastewater treatment works in South Africa using GC-TOFMS. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, v. 6, n. 4, p. 1, 2015.

SCHWANKE, C. *Ambiente: Tecnologias*. Série Tekne. Bookman ed., 2013.

SEITZ, W.; WINZENBACHER, R. A survey on trace organic chemicals in a German water protection area and the proposal of relevant indicators for anthropogenic influences. *Environmental monitoring and assessment*, v. 189, n. 6, p. 244, 2017.

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

SINGER, A. C.; COLIZZA, V.; SCHMITT, H.; ANDREWS, J.; BALCAN, D.; HUANG, W. E.; KELLER, V. D. J.; VESPIGNANI, A.; WILLIAMS, R. J. Assessing the ecotoxicologic hazards of a pandemic influenza medical response. *Environmental health perspectives*, v. 119, n. 8, p. 1084-1090, 2011.

SINGER, A. C.; JÄRHULT, J. D.; GRABIC, R.; KHAN, G.A.; LINDBERG, R.H.; FEDOROVA, G.; FICK, J.; BOWES, M. J.; OLSEN, B.; SÖDERSTRÖM, H. Intra- and Inter-Pandemic Variations of Antiviral, Antibiotics and Decongestants in Wastewater Treatment Plants and Receiving Rivers. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. e108621, 2014.

SMIRNOV, N. N. *Physiology of the Cladocera*. Academic Press, 2017.

SOBRAL, O.; CHASTINET, C.; NOGUEIRA, A.; SOARES, A. M.; GONÇALVES, F.; RIBEIRO, R. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 50 n. 3, p. 174-179, 2001.

SPIELMEYER, A.; HÖPER, H.; HAMSCHER, G. Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere*, v. 177, p. 232-238, 2017.

STOCKHOLM COUNTY COUNCIL. Environmentally Classified Pharmaceuticals 2014-2015, 2014. 29 p.

STRAUB, J. O. Combined environmental risk assessment for the antiviral pharmaceuticals ganciclovir and valganciclovir in Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 8, p. 2205–2216, 2017.

SUI, Q.; CAO, X.; LU, S.; ZHAO, W.; QIU, Z.; YU, G. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: a review. *Emerging Contaminants*, v.1, n. 1, p. 14-24, 2015.

SWANEPOEL, C.; BOUWMAN, H.; PIETERS, R.; BEZUIDENHOUT, C. Presence, concentrations and potential implications of HIV-Anti-Retrovirals in selected water resources in South Africa. *Water Research Commission. WRC Report*, n. 2144/1, p. 14, 2015.

TATARAZAKO, N.; ODA, S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*, v. 16, n. 1, p. 197-203, 2007.

THAYSEN, C.; STEVACK, K.; RUFFOLO, R.; POIRIER, D.; DE FROND, H.; DEVERA, J.; SHENG, G.; ROCHMAN, C. M. Leachate from expanded polystyrene cups is toxic to aquatic invertebrates (*Ceriodaphnia dubia*). *Frontiers in Marine Science*, v. 5, p. 71, 2018.

TIWARI, B.; SELLAMUTHU, B.; OUARDA, Y.; DROGUI, P.; TYAGI, R. D.; BUELNA, G. Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource technology*, v. 224, p. 1-12, 2017.

TON, S. S.; CHANG, S. H.; HSU, L. Y.; WANG, M. H.; WANG, K. S. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of disinfectants by *Daphnia magna* embryo assay. *Environmental pollution*, v. 168, p. 54-61, 2012.

TOUMI, H.; BOUMAIZA, M.; MILLET, M.; RADETSKI, C. M.; FELTEN, V.; FERARD, J. F. Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure? *Chemosphere*, v. 120, p. 351-356, 2015.

TOUMI, H.; BOUMAIZA, M.; MILLET, M.; RADETSKI, C. M.; FELTEN, V.; FOUQUE, C.; FÉRARD, J. F., Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Science of the total Environment*, v. 458, p. 47-53, 2013.

TRAVERSI, I.; GIOACCHINI, G.; SCOROLLI, A.; MITA, D. G.; CARNEVALI, O.; MANDICH, A. Alkylphenolic contaminants in the diet: *Sparus aurata* juveniles hepatic response. *General and Comparative Endocrinology*, v. 205, p. 185-196, 2014.

TYRING, S. K.; BAKER, D.; SNOWDEN, W. Valacyclovir for herpes simplex virus infection: long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 1, p. S40-S46, 2002.

United Nations 2015 Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 8th Revised edn. UN, New York

URSO, R.; BLARDI, G.; GIORGI, G. A short introduction to pharmacokinetics. European review for medical and pharmacological sciences, Roma, v. 6, n. 2, p. 33-44, 2002.

VÄÄNÄNEN, H. K.; HÄRKÖNEN, P. L. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas*, v. 23, p. S65-S69, 1996.

VCCLAB. Virtual Computational Chemistry Laboratory. Disponível em: <http://www.vcclab.org>. Acessado em 15 de dezembro de 2020.

VEAL, G. J.; BACK, J. D. Metabolism of zidovudine. *General Pharmacology*, v. 26, n. 7, p. 1469-1475, 1995.

VERGEYNST, L.; VAN LANGENHOVE, H.; JOOS, P.; DEMEESTERE, K. Suspect screening and target quantification of multi-class pharmaceuticals in surface water based on large-volume injection liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 406, n. 11, p. 2533-2547, 2014.

VERGEYNST, L.; HAECK, A.; DE WISPELAERE, P.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K., Multiresidue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-magnetic sector mass spectrometry: method quality assessment and application in a Belgian case study. *Chemosphere*, v. 119, p. S2-S8, 2015.

VERGILI, I.; GENCDAL, S. Removal of organic matter and etodolac from pharmaceutical industry wastewater by PAC adsorption. *Water Environment Research*, v. 89, p. 641-651, 2017.

VERGILI, I.; KAYA, Y.; GÖNDER, Z. B.; BOERGERS, A.; TUERK, J. Occurrence and Prioritization of Pharmaceutical Active Compounds in Domestic/Municipal Wastewater Treatment Plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 102, p. 252–258, 2019.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química nova*, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; ROSAS-L, E.; REYES, J. L. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 136, n. 2, p. 127-134, 2003.

VON TUNGELN, L. S.; HAMILTON, L. P.; DOBROVOLSKY, V. N.; BISHOP, M. E.; SHADDOCK, J. G.; HEFLICH, R. H.; BELAND, F. A. Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F(1)/Tk p<sup>-</sup> mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine. *Carcinogenesis*, v. 23, p. 1427-1432, 2002.

WALKER, U. A.; SETZER, B.; VENHOFF, N. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS*, v. 16, n. 16, p. 2165-2173, 2002.

WANG, K. S.; LU, C. Y.; CHANG, S. H. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. *Journal of hazardous materials*, v. 190, n. 1-3, p. 520-528, 2011.

WANG, Y.; LI, Y.; HU, A.; RASHID, A.; ASHFAQ, M.; WANG, Y.; WANG, H.; LUO, H.; YU, C.; SUN, Q. Monitoring, mass balance and fate of pharmaceuticals and personal care products in seven wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Journal of hazardous materials*, v. 354, p. 81-90, 2018.

WILBY, K. J.; KIANG, T. K.; ENSOM, M. H. H. Pharmacology and Pharmacokinetic Properties of Available Antiretrovirals. In: *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Interactions Associated with Antiretroviral Drugs*. Singapore: Adis, p. 15-25, 2016.

WOOD T. P.; DUVENAGE, C. S.; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. *Environmental Pollution*, v. 199, p. 235-243, 2015.

WOODING, M.; ROHWER, E. R.; NAUDÉ, Y. Determination of endocrine disrupting chemicals and antiretroviral compounds in surface water: a disposable sorptive sampler with comprehensive gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry and large



volume injection with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1496, p. 122-132, 2017.

WU, W. Z.; LI, W.; XU, Y.; WANG, J. W. Long-term toxic impact of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the reproduction, sexual differentiation, and development of different life stages of *Gobiocypris rarus* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, v. 48, n. 3, p. 293-300, 2001.

YILMAZ, G.; KAYA, Y.; VERGILI, I.; GÖNDER, B.; ÖZHAN, G.; CELIK, B. O.; ALTINKUM, S. M.; BAGDATLI, Y.; BOERGERS, A.; TUERK, J. Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 189, n. 55, 2017.

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

ZHANG, L.; GIBBLE, R.; BAER, K. N. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 55, n. 3, p. 330-337, 2003.

ZHU, H.; FU, S. F.; SU, Y.; ZHANG, Y. Effects of nanoplastics on microalgae and their trophic transfer along food chain: Recent advances and perspectives. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 23, p. 1873-188, 2021.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; REITANO, G.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; POMATI, F.; ROSSETTI, C.; CALAMARI, D. Pharmaceuticals in the environment in Italy: Causes, occurrence, effects and control. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 13, n. 1, p. 15-21, 2006.

**ANEXO 1**  
**PROTOCOLO DO ENSAIO DE EMBRIOTOXICIDADE**

## 1. Objetivo

Este protocolo visa estabelecer um método para avaliação da embriotoxicidade com *Daphnia* sp. para contaminantes emergentes.

## 2. Vidrarias e equipamentos e reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados na realização do ensaio devem ser de grau analítico P.A., todos os materiais utilizados no ensaio devem ser de vidro ou quimicamente inertes.

- Balança analítica;
- Balão volumétrico;
- Bécher de 1000 mL e 2000 mL;
- Incubadora com controlador de fotoperíodo e de temperatura;
- Medidor de condutividade (quando não acoplado ao equipamento);
- Medidor de oxigênio dissolvido;
- Medidor de pH;
- Microscópio óptico;
- Pêra de sucção;
- Pinça metálica de ponta fina;
- Placas de petri 90x15 mm;
- Pipeta graduada;
- Pipeta volumétrica;
- Pipeta com diâmetro adequado para o manuseio dos organismos-teste;
- Proveta;
- Termômetro.

## 3. Limpeza de material

As vidrarias utilizadas no cultivo dos organismos devem ser limpas com solução de ácido clorídrico 10%, detergente neutro, água de torneira e água processada.

A vidraria utilizada com amostras deve ser limpa com detergente neutro, água de torneira, acetona, água de torneira, solução de ácido nítrico 10% ou solução de ácido clorídrico 10%. Para o processo de enxágue, utilizar água de torneira e água processada.

#### **4. Água de diluição**

A água utilizada para diluição pode ser reconstituída ou natural, conforme os requisitos da NBR 12.713 (ABNT, 2016).

#### **5. Organismos-teste**

Os organismos-teste são embriões de *Daphnia*, cultivadas nas condições estabelecidas no item 3.3.1.

#### **6. Método de ensaio**

O preparo da amostra irá variar de acordo com as características inerentes a elas. No caso dos PFCs, verificar a solubilidade deles com a água de diluição e se há ou não a necessidade de uso de um solvente.

Fêmeas prenhes são selecionadas das culturas e examinadas microscopicamente quanto ao nível de desenvolvimento dos embriões que precisam estar nos estágios 1-2 (ver Figura 16). Os embriões nesses estágios não apresentam nenhuma diferenciação celular.

Para a remoção dos embriões aplica-se uma leve pressão na região posterior da câmara de incubação com uma pinça metálica com ponta fina. Os embriões extrudados foram coletados e agrupados em um bécher de 50 mL contendo água de cultivo.

Os ensaios foram realizados em placas de petri 90x15 mm contendo 20 mL da solução-teste ou 20 mL da água de diluição (controle). Em cada placa 10 embriões são expostos aleatoriamente. O ensaio é realizado com 5 concentrações-teste mais o controle e é mantido em uma incubadora a  $20 \pm 1$  °C com fotoperíodo de 16 h de luz.

O ensaio possui duração de 96 horas e a cada 24 horas, os embriões são inspecionados sob um microscópio óptico, onde todos são diariamente fotografados e

anotações são feitas com a finalidade de registrar toda a mortalidade e quaisquer anormalidades no desenvolvimento.

As principais anormalidades morfológicas são: interrupção do desenvolvimento embrionário, anomalias nas antenas, espinho caudal, olho composto e carapaça.

Não foi realizado renovação da solução-teste durante o período do ensaio.

Após o período de 96 horas avaliação do resultado é considerado válido se, no término do período de ensaio, a porcentagem das anormalidades dos organismos no controle for inferior ou igual a 10%.

**ANEXO 2**  
**ARTIGO PUBLICADO NA WATER AND SCIENCE TECHNOLOGY**  
**QUALIS A1**

## Chronic Toxicity and Environmental Risk Assessment of Antivirals in *Ceriodaphnia dubia* and *Raphidocelis subcapitata*

L. C. Almeida<sup>\*^</sup>, A. C. Mattos<sup>\*</sup>, C. P. G. Dinamarco<sup>\*</sup>, N. G. Figueiredo<sup>\*\*</sup>, D. M. Bila<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Engineering College, State University of Rio de Janeiro, São Francisco Xavier street, 524, 2029-F, Maracanã, Rio de Janeiro, 20550-900, RJ

<sup>\*\*</sup> National Institute of Technology, Venezuela Avenue, 82, 20081-312, RJ

<sup>^</sup>Corresponding author

(E-mail: ludmilacunhabio@gmail.com; agapemattos@yahoo.com.br; cpgcamila@gmail.com; nataliauff@gmail.com; danielebilauerj@gmail.com)

### Abstract

Antiviral drugs are a class of medications used for treating viral infections. Due to their widespread use, especially in cases of pandemics and limited human metabolism, antivirals have been detected in multiple environmental matrices. This study aims to evaluate the chronic effects of acyclovir, efavirenz, lamivudine and zidovudine using *Ceriodaphnia dubia* and *Raphidocelis subcapitata*. The results with *R. subcapitata* showed the following toxicities: zidovudine ( $IC_{50} = 5.442 \text{ mg L}^{-1}$ ) < acyclovir ( $IC_{50} = 3.612 \text{ mg L}^{-1}$ ) < lamivudine ( $IC_{50} = 3.013 \text{ mg L}^{-1}$ ) < efavirenz ( $IC_{50} = 0.034 \text{ mg L}^{-1}$ ). Results of chronic bioassay with *C. dubia* demonstrated that zidovudine is the least toxic ( $EC_{50} = 5.671 \text{ mg L}^{-1}$ ), followed by acyclovir ( $EC_{50} = 3.062 \text{ mg L}^{-1}$ ), lamivudine ( $EC_{50} = 1.345 \text{ mg L}^{-1}$ ) and efavirenz ( $EC_{50} = 0.026 \text{ mg L}^{-1}$ ). Both species have been shown to be sensitive to efavirenz. A risk quotient (RQ) was calculated, and efavirenz had an RQ greater than 1 for both species, and lamivudine had an RQ greater than 1 for *C. dubia*, representing a high ecological risk for these organisms. Antivirals pose a significant environmental risk to aquatic organisms and should be taken into consideration in future monitoring of water sources.

### Keywords

Antivirals, *Ceriodaphnia dubia*, chronic assays, ecotoxicity, environmental risk, *Raphidocelis subcapitata*

## INTRODUCTION

Antiviral drugs have only recently been recognized as emerging contaminants, and conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to remove them efficiently (Prasse et al. 2010; Ngumba et al. 2016; Nannou et al. 2020). Therefore, WWTPs play an important role as pollution source of antivirals in the environment. The physicochemical characteristics of antivirals (water solubility, molecular weight, chemical structure, volatility, and polarity) vary widely; therefore, there is a possibility that they would show recalcitrance in wastewater treatment (Jain et al. 2013; Evgenidou et al. 2015; Schoeman et al. 2017). Despite advances in water treatment technologies, effluents remain an important source of antiviral load due to low removal efficiencies (Funke et al. 2016).

The consumption of antivirals has been increasing due to infections and viral pandemics worldwide. Antiviral drugs are a group of pharmacologically active compounds used for treating viral infections, including herpes, hepatitis, human immunodeficiency virus (HIV) and influenza (De Clercq 2004). Despite their importance in treating a variety of diseases, the occurrence and fate of antiviral drugs in the urban water cycle have been less investigated than those of other pharmaceutical products, such as antibiotics, analgesics or antihypertensives (Evgenidou et al. 2015; Dong et al. 2016). These are discharged in effluents from production facilities and, after therapeutic use, through human excretion or direct discharge (Jain et al. 2013). Consequently, several antivirals have been detected in environmental matrices (Funke et al. 2016; Abafe et al. 2018; Mosekiemang et al. 2019); however, they are not always systematically monitored, and ecotoxicological effects remain unknown.

Acyclovir (ACV) is one of the oldest and most widely used antiviral drugs to treat infections caused by the herpesvirus family, including herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2, Varicella zoster virus (VZ), Epstein Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) (De Clercq 2004). It is prescribed for patients with weakened immune systems to control pathologies such as viral conjunctivitis (Bryan-Marrugo et al. 2015). It was found the ACV, of which 45–75% is excreted by patients as unchanged compound (Vergin et al. 1995). Thus, ACV, like other pharmaceuticals, finds its way into the environment through wastewater collection systems (Hernando et al. 2006). Efavirenz (EFV) is a



nonnucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) that has been widely used to treat mutant strains of HIV-1 since 1998 and is the third most commonly used antiretroviral by HIV-positive people worldwide (Larru et al. 2014). According to Eckhardt & Gulick (2017), 16–61% of EFV is eliminated in faeces (primarily as parent drug) and 14–34% in urine (primarily as metabolite). Lamivudine (3TC) is a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor, that interferes with the reverse transcriptase (RT) activity of a virus, causing pro-viral DNA chain termination (De Clercq 2004). Lamivudine is largely excreted in the urine (approximately 70%) as an unchanged drug (FDA 2017). Zidovudine, also known as azidothymidine (AZT), was approved in 1987, making it the first antiretroviral drug approved. AZT is a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor class that inhibits the activity of reverse transcriptase enzymes, stopping viral replication of HIV (De Clercq 2004). AZT is excreted in urine as a primary metabolite (45%) and as an unchanged drug (29%) (FDA 2008).

Acyclovir is the most investigated drug in many countries (Prasse et al. 2010; Bradley et al. 2014; Azuma et al. 2016). The highest concentration of ACV in surface waters was measured in the United States at 1,410 ng L<sup>-1</sup> (Bradley et al. 2014). The concentration levels of EFV indicate that it is a recalcitrant antiviral drug (Schoeman et al. 2017); the drug has a high volume of production and is likely to be persistent and/or bioaccumulative (Howard & Muir 2011). EFV was detected in effluents at concentrations of 17.4 to 34 µg L<sup>-1</sup> (Schoeman et al. 2015; Abafe et al. 2018) and in surface waters at a maximum concentration of 2.45 µg L<sup>-1</sup> (Mtolo et al. 2019). Some studies have quantified lamivudine in surface waters at concentrations ranging from 11.5 ng L<sup>-1</sup> to 167 µg L<sup>-1</sup> in Kenya (K'oreje et al. 2016; Ngumba et al. 2016), and in effluent at concentrations ranging from 22 ng L<sup>-1</sup> to 31 µg L<sup>-1</sup> (K'oreje et al. 2016; Ngumba et al. 2016). Abafe et al. (2018) found concentrations of zidovudine in wastewater influent and effluents to be as high as 53 µg L<sup>-1</sup> and 500 ng L<sup>-1</sup>, respectively. In surface waters, AZT was detected at concentrations up to 17 µg L<sup>-1</sup> in Kenya (K'oreje et al. 2016), and Prasse et al. (2010) detected AZT at concentrations up to 170 ng L<sup>-1</sup> in Germany.

Some antivirals are bioactive and highly persistent in aquatic environments, and they may negatively affect nontarget organisms (Jain et al. 2013). Antivirals can be toxic and represent one of the most hazardous pharmaceuticals towards algae, daphnia and

fish (Sanderson et al. 2004). Antiviral drugs released to the environment are of concern due to potential long-term effects on wildlife and viral resistance development (Nannou et al. 2020). Currently, very few studies have been published on their toxicity in aquatic organisms, requiring further investigation.

*Raphidocelis subcapitata* and *Ceriodaphnia dubia* are important organisms in aquatic ecosystems. Microalgae play an important role in maintaining the balance of water bodies and have been frequently used in ecotoxicological bioassays because they are important for assessing the toxicity of organic and inorganic compounds (Cho et al. 2008; Zhang et al. 2015). Numerous studies have utilized microalgae due to their ecological significance, easy cultivation, rapid response and high sensitivity to various environmental contaminants (Petsas & Vagi 2017). *Ceriodaphnia dubia* belongs to the cladocerans, a group of zooplankton that are broadly distributed in tropical areas, although it is also found in some temperate habitats (Jaikumar et al. 2018). These organisms play an important role in the food chains of freshwater habitats worldwide and can be used in a kind of standardized test (Thaysen et al. 2018).

In the present study, we aimed to perform an environmental risk assessment and assess the chronic effects of four antivirals using two species of aquatic organisms, the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* and the green alga *Raphidocelis subcapitata*. The selected compounds, acyclovir, efavirenz, lamivudine and zidovudine, are representative of the class of antivirals and were chosen based on their increasing consumption worldwide and lack of ecotoxicological data. Finally, after assessing the environmental risk based on EMA (2006), the risk quotient (RQ) of each drug was estimated, which will contribute to the knowledge of the environmental risks associated with these antivirals.

## **METHODS**

### **Chemicals**

Acyclovir and lamivudine were purchased from Sigma Aldrich (purity: 94.9% and 96%, respectively), efavirenz and zidovudine were purchased from the National Institute for Quality Control in Health - INCQS, Fiocruz (purity: 99.6% and 99.4%, respectively).

**Table 1** presents the physicochemical properties of antiviral drugs, their structure, and molecular weight.

Stock solutions of each drug were prepared separately in culture media specific to each organism, stirred for 30 minutes after preparation, for complete solubilization of the compounds. It was used the concentrations of 20 mg L<sup>-1</sup> for acyclovir, lamivudine and zidovudine and 1 mg L<sup>-1</sup> for efavirenz. Efavirenz stock solution (1 mg L<sup>-1</sup>) was prepared by dissolving the compound in 0.1% methanol, v/v. This procedure was necessary due to the low solubility of this drug in water.

### ***Raphidocelis subcapitata* cultures**

The green alga strain *Raphidocelis subcapitata* was obtained from the Culture Collection of Sanitary Engineering Laboratory of University of the State of Rio de Janeiro. The algae were cultured in 1000 ml flasks with approximately 500 mL of medium prepared according to NBR 12648 (ABNT, 2018). The cultures were maintained in the lab by re-inoculating in sterilized flasks with freshly prepared medium at once a week.

### **Chronic bioassay with *Raphidocelis subcapitata***

Algal growth inhibition tests were performed in accordance with the procedure described by NBR 12648 (ABNT, 2018) using freshwater algae *Raphidocelis subcapitata* in exponential growth phase.

Erlemeyers flasks with capacity of 150 mL filled with 50 mL of test solution or contaminant-free culture medium (control) were used. In the case of Efavirenz, it was necessary to add a solvent control (culture medium + methanol) with a nominal concentration of 0.1% methanol (v/v).

After 96 hours of cultivation the cell density was determined by counting cells in an improved Neubauer hemocytometer using an optical microscope (Eclipse E200, Nikon). After exposure and counting the number of cells in the Neubauer chamber, the percent inhibition of growth rate was calculated by comparing each treatment group with the control, using Equation 1:

$$\%I_r = \mu_c - \mu_t / \mu_c \times 100 \quad (1)$$

Where:

% I<sub>r</sub>: percent inhibition in average specific growth rate

μ<sub>c</sub>: mean value for average specific growth rate (μ) in the control group

μ<sub>t</sub>: average specific growth rate for the treatment replicate.

Initially, a preliminary test was performed with the drugs to determine the concentration range that cause sublethal effects. For each drug, three independent trials were performed, all in triplicate with exposure of the microalgae in five concentrations of acyclovir (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mg L<sup>-1</sup>), six concentrations of efavirenz (0.008; 0.016; 0.031; 0.062; 0.125 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>), five concentrations of lamivudine (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mg L<sup>-1</sup>) and five concentrations of zidovudine (1.25; 2.5; 5; 10 and 20 mg L<sup>-1</sup>). Negative control maintained with LC Oligo culture medium and the positive control prepared with potassium chloride (KCl) were used in the concentrations of 20, 10, 5, 2.5 g L<sup>-1</sup>.

The algal growth inhibition at each test concentration was calculated from the average percentage of cell growth inhibition (% I<sub>r</sub>) of each drug compared with the control which do not contain acyclovir, efavirenz, lamivudine or zidovudine.

### ***Ceriodaphnia dubia* cultures**

Group cultures constituted by 30 adults were maintained in reconstituted water with pH 7.2 - 7.6 and hardness between 44 - 47 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> in a 1 L glass. Cultures were incubated under controlled conditions of temperature (25±2 °C) and photoperiod (16 hL:8 hD). Total change of the culture water was carried out three times a week, avoiding temperature differences greater than 2 °C. The newly born neonates were removed and counted every day. These microcrustaceans were fed daily with a suspension of the chlorophyll algae *R. subcapitata* cultured in CHU-12 medium (10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>). A food supplement constituted of a yeast suspension (0.5%) and fermented fish food (0.5%) was added (1 ml L<sup>-1</sup>) as recommended by NBR 13373 (ABNT, 2017).

### **Chronic bioassay with *Ceriodaphnia dubia***

Chronic bioassay with *C. dubia* was conducted following general recommendations by NBR 13373 (ABNT, 2017) and lasted for 8 days. Experiments initiate with neonates aged between 6 and 24 hours of life. Three independent experiments were performed for the studied antivirals. Each test consisted of 5 concentrations, the control group with 10 replicates per concentration and 1 test organism in each replicate. Test organisms were kept in tubes with 10 mL of the test solution or 10 mL of reconstituted water (control). Hardness, pH, and oxygen were monitored every total change.

Acyclovir tests were performed with the following solutions (20; 10; 5; 2.5 and 1.25 mg L<sup>-1</sup>), Efavirenz (0.5; 0.25; 0.125; 0.062 and 0.031 mg L<sup>-1</sup>), Lamivudine (10; 5; 2.5; 1.25 and 0.625 mg L<sup>-1</sup>) and Zidovudine (20; 10; 5; 2.5 and 1.25 mg L<sup>-1</sup>) Control solution, 30 replicates, was prepared with culture water, free of drugs.

During 8 days, the organisms were checked daily for mortality and the offspring were counted and removed from the test tube. The biological parameter evaluated was the number of neonates.

### *Environmental Risk Assessment*

Environmental risk assessment of acyclovir, efavirenz, lamivudine and zidovudine were based on the regulatory scope of the European Medicines Agency (EMA, 2006) and Zhao et al. (2010). The values of Risk Quotients (RQs) for aquatic organisms were calculated from the measured environmental concentration (MEC) in surface waters and the predicted no-effect concentration (PNEC) (obtained from the battery of bioassays performed in the present study). PNEC is calculated by applying an assessment factor (AF) of 10 to the EC<sub>50</sub> (50% effective concentration) or NOEC (No Observed Effect Concentration) value of aquatic species (Equation 2). AF is an expression of the degree of uncertainty in the extrapolation of a limited number of species to complex ecosystems in the real environment and is responsible for intra and interspecies variations in sensitivity, and laboratory data for extrapolation of impact in the field (EMA, 2006).

$$\text{PNEC} = \text{NOEC ou EC}_{50}/10$$

(2)

RQ values for aquatic organisms were established based on the ratio between the measured environmental concentrations (MEC) (in the present study, the MEC was obtained from data in the literature) and PNEC whose data were obtained from the battery of bioassays performed in the present study (Equation 3).

$$RQ = \text{MEC/PNEC} \quad (3)$$

From the resulting RQ, it is possible to assess the risk that each drug presents for each aquatic organism analysed. A risk classification criterion used by Hernando et al. (2006) was applied:  $RQ < 0.1$  indicated minimum risk,  $0.1 < RQ < 1$  indicated intermediate risk, and  $RQ > 1$  indicated high environmental risk

### **Data analysis**

All the compounds were tested 3 times (three independent assays). EC50 and IC50 values were determined as the estimated concentrations at which 50% of the reproduction of *C. dubia* was affected and the growth of the algal population was inhibited by 50%, respectively, as determined in GraphPad Prism® software version 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, 2007) using nonlinear regression with a 95% confidence interval. All results are expressed as the mean + standard deviation of three experiments performed alone with 10 replicates per concentration in the case of *C. dubia* and 3 replicates per concentration for *R. subcapitata*. The results were analysed with GraphPad 5.0 software using analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett test for comparisons of means in relation to the control. P values equal to or less than 0.05 were considered statistically significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Chronic assay with *Raphidocelis subcapitata***

The IC50 and NOEC values of each antiviral for *R. subcapitata* are shown in Table 2. The values represent the average of three independent experiments. From these IC50

results, it was found that the chronic *R. subcapitata* toxicity of the antivirals decreased in the order of EFV > 3TC > ACV > ZDV. The most toxic antiviral for the algae was efavirenz, with NOEC and IC50 values of 0.008 mg L<sup>-1</sup> and 0.034 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

Chronic toxicity tests (96 h) showed that all compounds had concentrations that significantly inhibited the growth rate of *R. subcapitata* except zidovudine, for which a significant increase in the microalga was found at a concentration of 1.25 mg L<sup>-1</sup>, indicating a hormesis effect (Figure 1(d)). In the microalgae test shown in Figure 1(a), acyclovir significantly inhibited the growth of the alga at concentrations of 2.5 to 20 mg L<sup>-1</sup> compared to that in the control group ( $p < 0.05$ ). For efavirenz, significant growth inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed in *R. subcapitata* populations exposed to concentrations of 0.016 to 0.25 mg L<sup>-1</sup> (Figure 1(b)), and lamivudine at concentrations of 2.5 to 20 mg L<sup>-1</sup> significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) microalgal growth (Figure 1(c)). The dose-response curves generated in the growth inhibition assay from the experimental results are shown in Figure 1.

### **Chronic assay with *Ceriodaphnia dubia***

The results of short-term chronic exposure tests for *Ceriodaphnia dubia* presented in Table 3 show variation in toxicity among the antivirals, with the following order based on the EC50: zidovudine < acyclovir < lamivudine < efavirenz. The most toxic antiviral for *C. dubia* was efavirenz, with NOEC and EC50 values of 0.016 mg L<sup>-1</sup> and 0.026 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

The results of the chronic toxicity tests showed that the tested concentrations of acyclovir, efavirenz and lamivudine caused a reduction in the fertility of females. However, synergistic effects at concentrations of 1.25 and 2.5 mg L<sup>-1</sup> AZT were also observed (Figure 2(d)). Acyclovir caused a significant fertility decrease in females of *C. dubia* exposed to concentrations of 2.5 to 20 mg L<sup>-1</sup> when compared to the control group according to the Dunnett test ( $p < 0.05$ ) (Figure 2(a)). A significant decrease in fertility ( $p < 0.05$ ) was observed in the test organisms exposed to efavirenz concentrations of 0.031 to 0.25 mg L<sup>-1</sup>, which proved to have a high level of toxicity (Figure 2(b)). For lamivudine, a significant reduction in neonates ( $p < 0.05$ ) was observed at concentrations from 1.25

to  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Figure 2(c)). Ecotoxicological tests performed using *R. subcapitata* and *C. dubia* for the antivirals ACY, AZT and 3TC yielded  $\text{EC}_{50}$  values between 1 and  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , indicating that these antivirals can be classified as 'toxic' based on the 93/67/EEC directive on risk assessment (EC 1996). EFV showed an  $\text{EC}_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$  and was thus classified as 'very toxic'. Based on ecotoxicity values obtained by chronic exposure assays, the compounds were classified as established by the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (UN 2015) as follows: ACY, AZT and 3TC were toxic and EFV was highly toxic for both species.

Chronic values (ChVs) of acyclovir predicted by ECOSAR were estimated at  $3.89 \text{ mg L}^{-1}$  for fish,  $2.04 \text{ mg L}^{-1}$  for water fleas and  $3.62 \text{ mg L}^{-1}$  for microalgae. According to Mayo-Bean et al. (2011), the ChV is defined as the geometric average Q4 of the no observed effect concentration (NOEC) and the lowest observed effect concentration (LOEC). The chronic value found in this study for the ACV test for *C. dubia* and *R. subcapitata* was  $1.76 \text{ mg L}^{-1}$ , showing similarity with the data presented in ECOSAR. The ECOSAR program predicts the acute toxicity of acyclovir, and the  $\text{LC}_{50}$  for fish and *Daphnia* was estimated to be  $1.76 \times 10^3$  and  $69.2 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. These values are higher than the threshold for chronic toxicity because the tests are acute, generally exposing the organism during a short period of its life cycle, and criteria such as lethality or immobility are observed. The environmental relevance of laboratory chronic toxicity data is important to consider when interpreting the potential for antivirals to negatively affect aquatic ecosystems. Based on the experimental results presented in this study, the concentrations tested were high, analogous to aquatic environments with a high load of antivirals, such as those observed in densely populated regions with many HIV-positive individuals, poor sanitation systems and drinking water treatment, and low rates of precipitation, which would otherwise dilute the antivirals when entering water bodies (Nannou et al. 2020).

The molecular structure of compounds and their dissociated forms at different pH values can influence their bioavailability in the absorption process and toxicity to organisms (National Research Council 2014). Water pH is an important environmental factor that limits species distributions in aquatic habitats (Schwanke 2013). The ionization state is controlled by the pH of the solution and by the acid-dissociation constants (i.e.,



pKa values) (Babićet al. 2007). Based on the pKa values of acyclovir (3.02 and 11.98), zidovudine (3 and 9.96), lamivudine (0.16 and 14.29) and efavirenz (1.5 and 12.52), at a pH of approximately 7, the ACV, EFV and 3TC antivirals are mostly (above 99%) in their neutral form, while AZT is predominantly in its cationic form (Table 1). These different chemical species (cationic, neutral or anionic) generally have very different properties, such as water solubility, volatility, UV absorption and reactivity with chemical oxidants (Babićet al. 2007).

In this study, the increase in the number of neonates per female of *C. dubia* and the hormesis effect on microalgae exposed to low concentrations may have been caused by the presence of nitrogen in the zidovudine molecule. The toxicity test was carried out at pH values ranging from 7.2 to 7.6. Under this condition, the predominant species of the AZT molecule is represented in Table 1 with positive and negative charges on the final nitrogen of the chain, facilitating nitrogen fixation by algae and some animals that use it as an energy source (Boyd 2015). According to Babićet al. (2007), the ionized form is generally more soluble in water, while the neutral form is more lipophilic and has greater membrane permeability.

The data obtained in the chronic toxicity tests in this study with *C. dubia* showed that ZDV causes a reduction in fertility in females by 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> and high growth inhibition in *R. subcapitata* at the high concentrations tested (5, 10 and 20 mg L<sup>-1</sup>). However, stimulating effects (hormesis) of ARV have also been observed. In this study, the hormesis effect was verified in the test with microalgae at a concentration of 1.25 mg L<sup>-1</sup>, which represents 33.15% stimulation in relation to the control. This unusual but apparently beneficial effect observed at low doses has been previously reported for some bioindicators, such as microcrustaceans (Stanley et al. 2013), plants and algae (Cedergreen et al. 2007), in the presence of organic nitrogen compounds. Russo et al. (2017) examined the ecotoxicity of treated and untreated solutions of zidovudine, and *Raphidocelis subcapitata* showed a hormetic effect for stavudine and zidovudine when treated with solutions at various UV245 doses after dilution from 1:10 to 1:100. In addition to having a hormesis effect, AZT is known to be a cytostatic drug and can interfere with important physiological functions in nontarget organisms, causing molecular damage. The mechanism of action occurs through the (i) inhibition of nucleotides or DNA synthesis

(Garcia-Canton et al. 2013) and (ii) induction of mutations, micronuclei and genotoxicity (Von Tungeln et al. 2002). The genotoxicity of AZT was demonstrated by Onwuamah et al. (2014) using *Allium cepa* roots, in which the authors identified effects such as inhibition of root growth at high concentrations, changes in mitosis and the induction of chromosomal aberrations.

ECOSAR software estimated chronic values of EFV of 0.13 mg L<sup>-1</sup> for fish, 0.14 mg L<sup>-1</sup> for water fleas and 0.68 mg L<sup>-1</sup> for microalgae. The chronic value calculated for the data collected in this research was 0.022 mg L<sup>-1</sup> for *C. dubia* and 0.01 mg L<sup>-1</sup> for the microalga *R. subcapitata*. The results obtained in this study for *C. dubia* (EC50: 0.026 mg L<sup>-1</sup>) and for *R. subcapitata* (IC50: 0.034 mg L<sup>-1</sup>) using efavirenz show that this antiviral was the most toxic for both species, suggesting that environmental concentrations can affect the exposed biota. The high growth inhibition of *R. subcapitata* and the toxic effect on the reproduction of *C. dubia* by the drug EFV are worrying since they can affect the life cycle of these species and aquatic life at higher trophic levels. Increased resistance or toxicity in aquatic organisms presumably depends on the mode of action of the compounds (Dietrich et al. 2010). Studies have shown that EFV has mitotoxic action, meaning that it can interfere with the mitochondria of nontarget organisms, such as *C. dubia* and *R. subcapitata*. The drug triggers mitochondrial dysfunction characterized by direct inhibition of complex I of the electron transport chain, a decrease in the consumption of O<sub>2</sub>, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in the potential of the mitochondrial membrane (Funes et al. 2014; Apostolova et al. 2017). In addition to its mitotoxicity, studies have shown that EFV exposure can cause liver damage. Robson et al. (2017) investigated the exposure (96 h) of the fish *Oreochromis mossambicus* to an EFV concentration of 20.6 ng L<sup>-1</sup> and found liver damage and a general decline in the health of this species, indicating the importance of monitoring efavirenz. These results reinforce the need for more studies on the mechanisms of action of EFV to obtain more sensitive responses.

Unfortunately, no studies have revealed how lamivudine acts on the biochemical and physiological functions of cladocerans and microalgae. Nevertheless, some information about how 3TC could act in other organisms is available. Studies on somatic cells of *Drosophila melanogaster* have shown that 3TC induces mutagenic and

recombinogenic effects, causing genomic instability and loss of heterozygosity. These genetic changes play a primary role in carcinogenesis and are involved in secondary and subsequent stages of carcinogenesis, by which recessive oncogenic mutations are revealed (Franchi et al. 2009). Bayram & Topaktaş (2008) classified lamivudine as a weak inducer of exchange between sister chromatids, chromosomal aberrations and the presence of micronuclei in peripheral human lymphocytes in vitro.

The sensitivity was different among the test organisms for the investigated compounds: *C. dubia* was the most sensitive species to three antivirals (ACV, EFV and 3TC). *R. subcapitata* was more sensitive to AZT. This observation suggests that a battery of bioassays using test organisms belonging to various taxonomic groups and representative of various levels of the food chain is necessary to assess the ecotoxicity of substances (Baran & Tarnawski 2013).

### **Environmental Risk Assessment (ERA)**

Table 4 presents the worst-case scenario by using maximum MECs in the calculation of RQs for antivirals. Using the RQ classification in Hernando et al. (2006), the value for efavirenz in the Msunduzi River in South Africa was  $> 1$ , indicating that it poses a potential risk to both aquatic organisms tested in this study. These high RQ values are the result of high concentrations of EFV found in South African rivers and high toxicity of the drug. Risk quotients are calculated to help define the severity of the problem in future risk assessment efforts, determining which environmental components are potentially exposed to toxic concentrations of antivirals. According to this study, it is evident that *R. subcapitata* and *C. dubia* are very susceptible to environmental exposure to efavirenz. The predicted RQ for lamivudine in the Ngong River in Kenya for *C. dubia* was 2.69 (Table 4), indicating a high risk for this species, which is an important cladoceran and biological indicator of freshwater, and a medium risk for the microalga *R. subcapitata*. The risk assessment for acyclovir and zidovudine yielded RQ values  $< 1$ , indicating a low risk for the species studied. A chronic ecotoxicity experiment performed using the antiviral pharmaceuticals ganciclovir (GCV) and valganciclovir (VGCV) with *Raphidocelis subcapitata* and *Daphnia magna* as test organisms did not reveal persistence or bioaccumulation (Straub 2017). In the same study, a comparison between predicted

environmental concentrations (PECs) and predicted noeffect concentrations (PNECs) showed no significant risks for treated wastewater, surface water, groundwater or sediment; in addition, potential risks to (semi)aquatic top predators or to human consumers of water and fish were exceedingly low.

Water scarcity conditions have particularly affected highly populated areas in recent years (Fernández-López et al. 2021). Therefore, increasingly reused water as a supplementary source of water to rivers should be considered. Risk assessment of emerging contaminants primarily focuses on their toxicity to aquatic organisms such as fish, algae and daphnia. It is urgent to assess the risks to human health associated with the various pharmaceutical products detected in reused water (Lin et al. 2020). Studies show that these compounds can be toxic, and the risk to humans cannot be considered negligible (Prosser and Sibley, 2015).

## **CONCLUSIONS**

The results of the present study confirmed that one of the most commonly used antiviral drugs, efavirenz, is highly toxic to two aquatic organisms, with an EC<sub>50</sub> value of 26 µg L<sup>-1</sup> for *C. dubia* and an IC<sub>50</sub> value of 34 µg L<sup>-1</sup> for *R. subcapitata*, which are environmentally relevant concentrations. The RQs of efavirenz for both organisms and lamivudine for *C. dubia* exceeded 1, indicating a high ecological risk, whereas ACV, 3TC and ZDV could not have direct significant impacts on algae and cladocerans due to their lower toxicity. According to EU Directive 93/67/EEC, ACV, 3TC and AZT were classified as toxic, whereas EFV was a very toxic substance. Based on the results, we suggest monitoring efavirenz, as it poses a significant risk to aquatic organisms, and emphasize the need for testing with other aquatic species, soils and sediments, in order to expand the ecotoxicology spectrum

## **DECLARATIONS OF INTEREST**

None.

## FUNDING INFORMATION

This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES), the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

## REFERENCES

Abafe, O.A., Späth, J., Fick, J., Jansson, S., Buckley, C., Stark, A., Pietruschka, B. and Martincigh, B.S. (2018) LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in influents and effluents from wastewater treatment plants in KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere* **200**, 660-670.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas (2017). NBR 13373. Aquatic ecotoxicology—chronic toxicity—test with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera), Rio de Janeiro, Brazil.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas (2018). NBR 12648. Aquatic ecotoxicology—chronic toxicity—test with algae (Chlorophyceae), Rio de Janeiro, Brazil.

AFNOR - Association Française de Normalisation (1980). Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale T90-304.

Apostolova, N., Blas-Garcia, A., Galindo, M.J. and Esplugues, J.V. (2017) Efavirenz: what is known about the cellular mechanisms responsible for its adverse effects. *European Journal of Pharmacology* **812**, 163-173.

Babić, S., Horvat, A.J., Pavlović, D.M. and Kaštelan-Macan, M. (2007) Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry* **26** (11), 1043-1061.

Baran, A. and Tarnawski, M. (2013) Phytotoxkit/Phytotestkit and Microtox® as tools for toxicity assessment of sediments. *Ecotoxicology and environmental safety* **98**, 19-27.

Bayram, S. and Topaktaş, M. (2008) Confirmation of the chromosome damaging effects of lamivudine in in vitro human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis* **49** (4), 328-333.

- Boyd, C.E. 2015 Nitrogen. In: *Water Quality*, Springer, Cham, p. 223-241.
- Bradley, P.M., Barber, L.B., Duris, J.W., Foreman, W.T., Furlong, E.T., Hubbard, L.E., Hutchinson, K.J., Keefe, S.H. and Kolpin, D. W. (2014) Riverbank filtration potential of pharmaceuticals in a wastewater-impacted stream. *Environmental pollution* **193**, 173-180.
- Bryan-Marrugo, O.L., Ramos-Jiménez, J., Barrera-Saldaña, H., RojasMmartínez, A., Vidaltamayo, R. and Rivas-Estilla, A.M. (2015) History and progress of antiviral drugs: from acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina universitaria* **17** (68), 165-174.
- Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. (2002) Defining hormesis. *Human and experimental toxicology* **21** (2), 91-97.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. and Holland, C.D. (1999) Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Analysis* **19** (2), 261-281.
- Cedergreen, N., Streibig, J.C., Kudsk, P., Mathiassen, S.K. and Duke, S.O. (2007) The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose Response* **5** (2), 150–162.
- Commission of the European Communities, 1996. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) no. 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Part II: Environmental Risk Assessment Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- De Clercq, E. (2004) Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of clinical virology* **30** (2), 115-133.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F. and Laforsch, C. (2010) Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. *Chemosphere* **79** (1), 60-66.
- Dong, H., Yuan, X., Wang, W. and Qiang, Z. (2016) Occurrence and removal of antibiotics in ecological and conventional wastewater treatment processes: A field study. *Journal of environmental management* **178**, 11-19.
- European Commission, 2013. Directive 2013/39/UE of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as

regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, 24.8.2013 L 226/1.

Eckhardt, B.J. and Gulick, R.M. (2017) Drugs for HIV infection. In: *Infectious Diseases*, Elsevier, pp. 1293-1308.

European Medicines Evaluation Agency, 2006. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Ref EMEA/CRMP/SWP/4447/00.

Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K. and Lambropoulou, D.A. (2015) Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Science of the Total Environment* **505**, 905-926.

Franchi, L.P., Pentiado, N.H.G.R., do Nascimento Silva, R., Guimarães, N.N., Jesuino, R. S.A., de Andrade, H.H.R., Lehmann, M. and Cunha, K.S. (2009) Mutagenic and recombinagenic effects of lamivudine and stavudine antiretrovirals in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and chemical toxicology* **47** (3), 578-582.

Funes, H.A., Apostolova, N., Alegre, F., Blas-Garcia, A., Alvarez, A., Marti-Cabrera, M. and Esplugues, J.V. (2014) Neuronal bioenergetics and acute mitochondrial dysfunction: a clue to understanding the central nervous system side effects of efavirenz. *The Journal of Infectious Diseases* **210** (9), 1385-1395.

Funke, J., Prasse, C. and Ternes, T.A. (2016) Identification of transformation products of antiviral drugs formed during biological wastewater treatment and their occurrence in the urban water cycle. *Water research* **98**, 75-83.

Garcia-Canton, C., Anadon, A. and Meredith, C. 2013 Assessment of the in vitro  $\gamma$ H2AX assay by high content screening as a novel genotoxicity test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **757** (2), 158-166.

Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R. and Barceló, D. (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **69** (2), 334-342.

Howard, P.H. and Muir, D.C.G. (2011) Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce II: pharmaceuticals. *Environmental Science and Technology* **45**, 6938–6946.

Jager, T., Barsi, A. and Ducrot, V. (2013) Hormesis on life-history traits: is there such thing as a free lunch? *Ecotoxicology* **22** (2), 263-270.

Jain, S., Kumar, P., Vyas, R.K., Pandit, P. and Dalai, A.K. (2013) Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution* **224** (2), 1410.

K'oreje, K.O., Vergeynst, L., Ombaka, D., De Wispelaere, P., Okoth, M., Van Langenhove, H. and Demeestere, K. (2016) Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere* **149**, 238-244.

Larru, B., Eby, J. and Lowenthal, E.D. (2014) Antiretroviral treatment in HIV-1 infected pediatric patients: focus on efavirenz. *Pediatric health, medicine and therapeutics* **5**, 29.

Lin, X., Xu, J., Keller, A. A., He, L., Gu, Y., Zheng, W., Sun, D., Lu, Z., Huang, J., Huang, X. & Li, G. (2020) Occurrence and risk assessment of emerging contaminants in a water reclamation and ecological reuse project. *Science of the Total Environment* **744**, 140977.

Mayo-Bean, K., Nabholz, J., Clements, R., Zeeman, M., Henry, T., Rodier, D., Moran, K., Meylan, B. and Ranslow, P. (2011) Methodology document for the ECOlogical Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) class program: estimating toxicity of industrial chemicals to aquatic organisms using ECOSAR class program (Ver. 1.1). In: *US Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington, DC.*

Mosekiemang, T.T., Stander, M.A. and de Villiers, A. (2019) Simultaneous quantification of commonly prescribed antiretroviral drugs and their selected metabolites in aqueous environmental samples by direct injection and solid phase extraction liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Chemosphere* **220**, 983–992.

Mtolo, S.P., Mahlambi, P.N. and Madikizela, L.M. (2019) Synthesis and application of a molecularly imprinted polymer in selective solid-phase extraction of efavirenz from water. *Water Science and Technology* **79** (2), 356-365.

Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E. and Lambropoulou, D. (2020) Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity. *Science of The Total Environment* **699**, 134322.



- National Research Council. (2014) *A framework to guide selection of chemical alternatives*. National Academies Press.
- Ngumba, E., Gachanja, A. and Tuhkanen, T. (2016) Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi river basin, Kenya. *Science of the Total Environment* **539**, 206-213.
- Onwuamah, C.K., Ekama, S.O., Audu, R.A., Ezechi, O.C., Poirier, M.C. and Odeigah, P.G.C. 2014 Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. *PloS one* **9** (3), e90296.
- Petsas, A. S. & Vagi, M. C. (2017) Effects on the photosynthetic activity of algae after exposure to various organic and inorganic pollutants. In: Chlorophyll. IntechOpen.
- Prasse C., Schlüsener, M.P., Schulz, R. and Ternes, T.A. (2010) Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environmental Science and Technology* **44** (5), 1728-1735.
- Prism, G. (2007). Graphpad software. *San Diego, CA, USA*.
- Robson, L., Barnhoorn, I.E.J. and Wagenaar, G.M. (2017) The potential effects of efavirenz on *Oreochromis mossambicus* after acute exposure. *Environmental toxicology and pharmacology* **56**, 225-232.
- Schoeman, C., Mashiane, M., Dlamini, M. and Okonkwo, O.J. (2015) Quantification of selected antiretroviral drugs in a wastewater treatment works in South Africa using GC-TOFMS. *Journal of Chromatography and Separation Techniques* **6** (4), 1.
- Schwanke, C. 2013 *Ambiente: Tecnologias: Série Tekne*. Bookman ed.
- Stanley, J.K., Perkins, E.J., Habib, T., Sims, J.G., Chappell, P., Escalon, B.L., Wilbanks, M. and Garcia-Reyero, N. (2013) The good, the bad, and the toxic: approaching hormesis in *Daphnia magna* exposed to an energetic compound. *Environmental science and technology* **47** (16), 9424-9433.
- Straub, J.O. (2017) Combined environmental risk assessment for the antiviral pharmaceuticals ganciclovir and valganciclovir in Europe. *Environmental toxicology and chemistry* **36** (8), 2205-2216.
- Thaysen, C., Stevack, K., Ruffolo, R., Poirier, D., De Frond, H., DeVera, J., Sheng, G. and Rochman, C. M. (2018) Leachate from expanded polystyrene cups is toxic to aquatic invertebrates (*Ceriodaphnia dubia*). *Frontiers in Marine Science* **5**, 71.

United Nations (2019) *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): Eighth Revised Edition*, UN, New York, <https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en> (accessed October 2020).

USFDA. 2017 EpiVir (Lamivudine). [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/020564s37\\_020596s036lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020564s37_020596s036lbl.pdf) (accessed September 2020)

USFDA. 2008 Retrovir (Zidovudine) [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/019910s033lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019910s033lbl.pdf) (accessed September 2020)

Vergin, H., Kikuta, C., Mascher, H. and Metz, R. 1995 Pharmacokinetics and bioavailability of different formulations of Acyclovir. *Arzneimittel-Forschung* **45** (4), 508-515.

Von Tungeln, L.S., Hamilton, L.P., Dobrovolsky, V.N., Bishop, M.E., Shaddock, J.G., Heflich, R.H. and Beland, F.A. (2002) Frequency of Tk and Hpvt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F(1)/Tk+/- mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine. *Carcinogenesis* **23**, 1427-1432.

Zhang, Y., Sun, Q., Zhou, J., Masunaga, S. & Ma, F. 2015 Reduction in toxicity of wastewater from three wastewater treatment plants to alga (*Scenedesmus obliquus*) in northeast China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **119**, 132–139.

Substances	Chemical Structure	Predominant species at pH 7	pKa <sup>a</sup>	Log Kow <sup>a</sup>	Solubility in Water (mg mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
Acyclovir C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> 225.20 59277-89-3			3.02; 11.98	-1	9.08
Efavirenz C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> 315.67 154598-52-4			-1.5; 12.52	4.46	0.00855
Lamivudine C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S 229.26 134678-17-4			-0.16; 14.29	-1.1	2.76
Zidovudine C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> 267.2 30516-87-1			-3; 9.96	-0.3	16,3

**Table 1.** Substances, Chemical Structures, Predominant species at pH 7, Molecular Weight, CAS Number, Chemical Structure, pKa, log Kow and Solubility in Water.

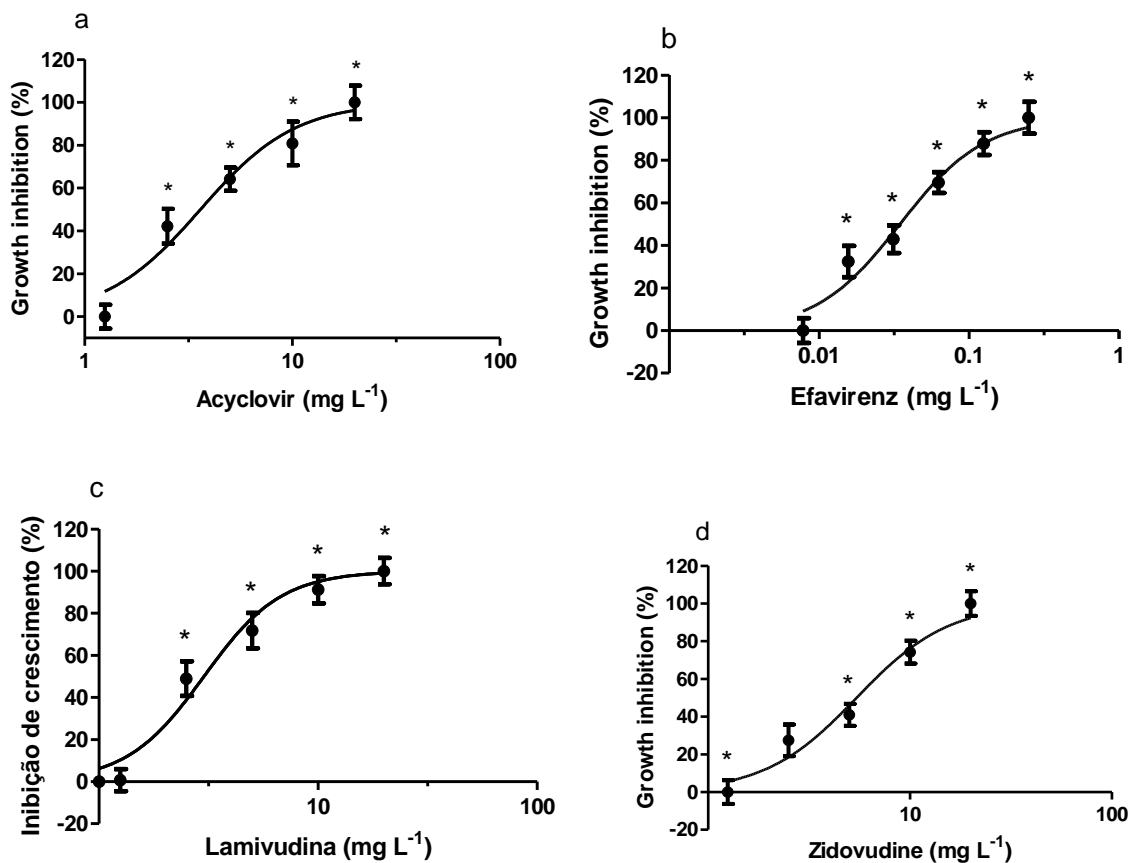
<sup>a</sup>Data from ChemAxon.

<sup>b</sup>Data from VCCLAB

Antivirals	<i>R. subcapitata</i>		
	IC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	LOEC (mg L <sup>-1</sup> )
Acyclovir	3.612 (3.249-4.016)	1.25	2.5
Efavirenz	0.034 (0.031-0.038)	0.008	0.016
Lamivudine	3.013 (2.753-3.297)	1.25	2.5
Zidovudine	5.442 (4.969-5.962)	Nd	Nd

**Table 2.** Chronic toxicity of antivirals to *R. subcapitata*

IC<sub>50</sub>: Inhibitory Concentration; NOEC: No Observed Effect Concentration; LOEC: Lowest Observed Effect Concentration; 95% confidence intervals are in parentheses; Nd: Not determined

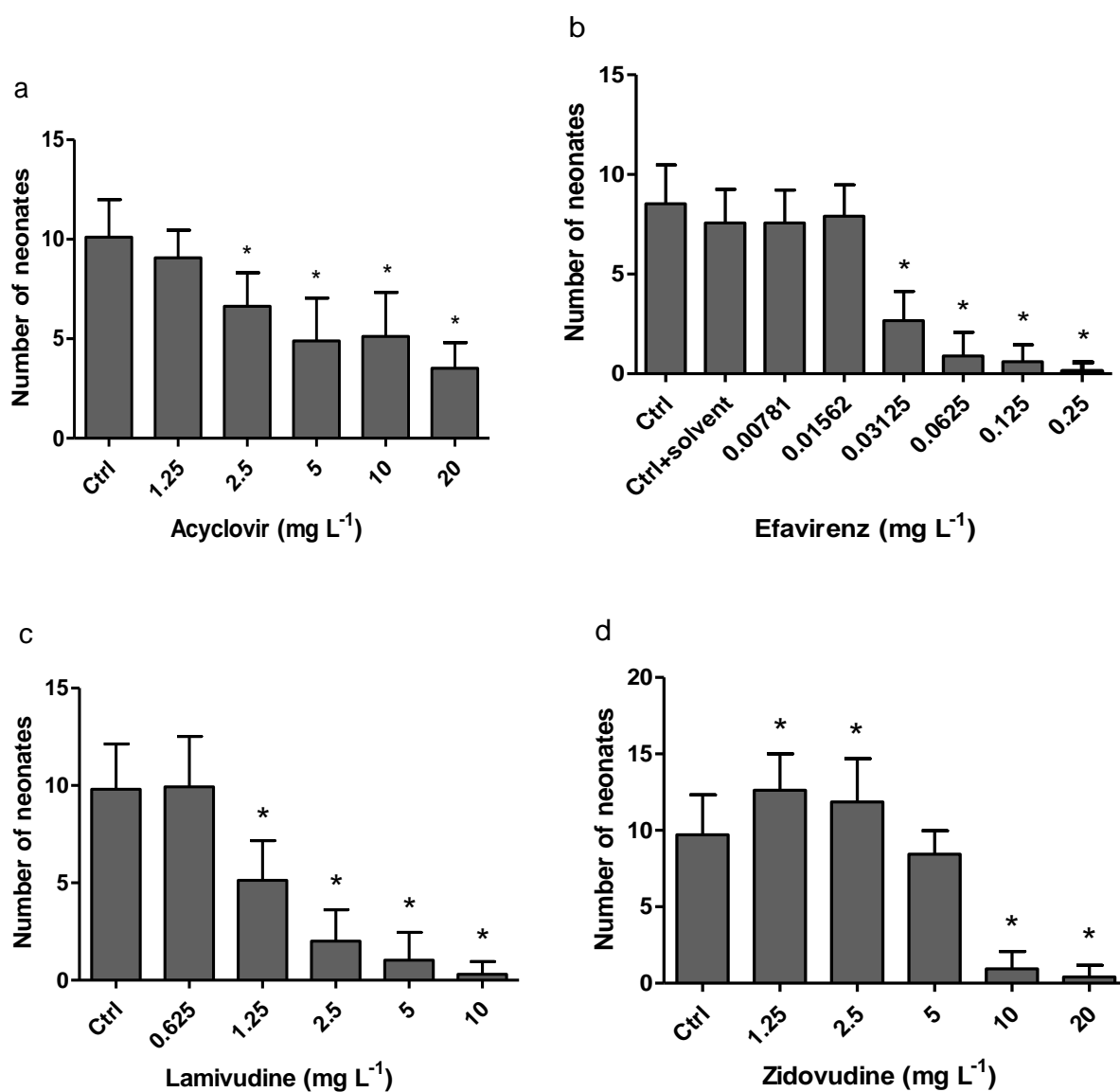


**Figure 1.** Growth inhibition of *R. subcapitata* algae exposed to the drugs acyclovir, efavirenz, lamivudine and zidovudine. The data represent mean 95% confidence intervals, presented as response curves of the logarithmic concentration of growth inhibition rate after 72 h of exposure. Significant differences compared to the control are marked with a \* symbol ( $p < 0.05$ ).

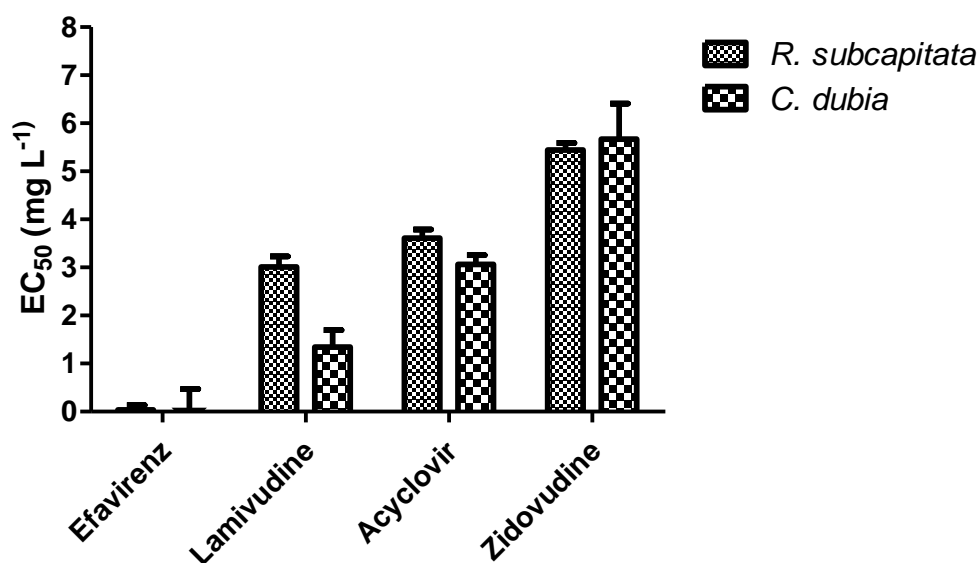
Antivirals	EC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	LOEC (mg L <sup>-1</sup> )
Acyclovir	3.062 (2.529 -3.707)	1.25	2.5
Efavirenz	0.026 (0.024-0.027)	0.016	0.031
Lamivudine	1.345 (1.242-1.456)	0.625	1.25
Zidovudine	5.671 (5.370-5.989)	Nd	Nd

**Table 3.** Chronic toxicity of antivirals to *C. dubia*.

EC<sub>50</sub>: 50% effective Concentration; NOEC: No Observed Effect Concentration; LOEC: Lowest Observed Effect Concentration; 95% confidence intervals are in parentheses; Nd: Not determined



**Figure 2.** Reproductive responses of *C. dubia* exposed for 8 days to acyclovir, efavirenz, lamivudine and zidovudine. The error bars correspond to the standard error and the asterisk represents statistically different (Dunnett's test,  $p \leq 0.05$ ) in relation to the control group.



**Figure 3.** Sensitivity of test organisms to antivirals efavirenz, lamivudine, acyclovir and zidovudine.

Antiviral	MEC <sub>Surface</sub>	PNEC <sup>a</sup>	RQ	PNEC <sup>a</sup>	RQ
	Water (ng L <sup>-1</sup> )	<i>R.</i> <i>subcapitata</i>	<i>R.</i> <i>subcapitata</i>	<i>C. dubia</i>	<i>C. dubia</i>
Acyclovir	1410 <sup>b</sup>	0.125	0.011	0.125	0.011
Efavirenz	2450 <sup>c</sup>	0.00078	3.14	0.0015	1.63
Lamivudine	167100 <sup>d</sup>	0.125	1.33	0.062	2.69
Zidovudine	17410 <sup>d</sup>	0.544	0.03	0.567	0.03

**Table 4.** Maximum measured environmental concentrations (MECs), predicted no-effects concentrations (PNECs) and risk quotients (RQs) for each antiviral.



<sup>a</sup>Value when dividing NOEC or EC<sub>50</sub> by an assessment factor of 10. For zidovudine, EC<sub>50</sub> was used

<sup>b</sup>BRADLEY et al., 2014

<sup>c</sup>MTOLO et al., 2019

<sup>d</sup>K'OREJE et al., 2016