

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

**RENATO SAKAI CID**

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DE MEDICAMENTOS ANTIRETROVIRAIS:  
CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS ESTIMADAS E EFEITOS BIOLÓGICOS EM  
OURIÇO-DO-MAR (*Echinometra lucunter*)**

**SANTOS/SP  
2020**

**RENATO SAKAI CID**

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DE MEDICAMENTOS ANTIRETROVIRAIS:  
CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS ESTIMADAS E EFEITOS BIOLÓGICOS EM  
OURIÇO-DO-MAR (*Echinometra lucunter*)**

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação da Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães e coorientação do Prof. Dr. Augusto Cesar e do Prof. Fernando Sanzi Cortez.

**SANTOS/SP**

**2020**

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

Cid, Renato Sakai.

Estudo ecotoxicológico de medicamentos antiretrovirais: concentrações ambientais estimadas e efeitos biológicos em ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*) / Renato Sakai Cid.

-- 2020.

35p.

Orientador: Luciana Lopes Guimarães

Coorientador: Augusto Cesar

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2020.

1. Antirretrovirais 2. Avaliação ecotoxicológica 3. Fármacos no ambiente 4. *Echinometra lucunter* 5. Concentração Ambiental Estimada I. Guimarães, Luciana Lopes, II. Cesar, Augusto III. Cortez, Fernando Sanzi IV. Estudo ecotoxicológico de medicamentos antiretrovirais: concentrações ambientais estimadas e efeitos biológicos em ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*)

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e esposa, que nos momentos difíceis me apoiaram e direcionaram  
minha vida para o melhor caminho.*

*Aos professores, pelo apoio no trabalho, ensino e principalmente pela atenção as  
necessidades, acompanhando o desenvolvimento do projeto e apostando na minha  
capacidade, dando bases sólidas para construir um grande futuro profissional.*

*A Prof. Dra. Luciana Lopes Guimarães que me incentivou a realizar o mestrado,  
orientando e dedicando seu tempo para ajudar a realizar o projeto.*

## AGRADECIMENTOS

É prazeroso poder agradecer o apoio em qualquer momento da vida, por isso não poderia deixar de agradecer aqueles que tornaram viável este trabalho por toda a disponibilidade demonstrada.

Agradeço a **Deus**, pois sem Ele nada do que feito se faria. Aos meus **Pais Regina e Luiz**, meu **Filho Leonardo** e minha **Esposa Nathalia** por sonharem meu sonho e financiarem parte deste trabalho com amor e cuidados.

Aos coorientadores **Prof. Augusto Cesar** e ao **Prof. Fernando Sanzi Cortez**, pelo apoio, paciência e confiança no trabalho. A orientadora **Profa. Luciana Lopes Guimarães**, por permitir a realização deste trabalho, pelo apoio, paciência, confiança e preocupação. Sou extremamente grato pela grande contribuição em meu crescimento acadêmico-científico.

Ao **Prof. Marcos Aurélio** pelo auxílio na obtenção de dados e amostras, e toda a ajuda disponibilizada durante o trabalho. Ao **Dr. Mario Pagotto** e ao **Sr. Jorge Costa, da Fundação Oswaldo Cruz**, pela doação dos fármacos antirretrovirais utilizadas nos experimentos.

A **Universidade Santa Cecília**, por ter cedido laboratórios, equipamentos, materiais e uma bolsa de estudos para a realização do Mestrado. A **Equipe Técnica do Laboratório de Ecotoxicologia** da Universidade Santa Cecília, que sempre ajudou a fazer o trabalho da melhor maneira possível, com a sua dedicação e atendimento em todas as necessidades dos experimentos realizados.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## EPÍGRAFE

*“Nunca ande apenas pelos caminhos traçados, pois eles conduzem somente até onde os outros já foram.”*

*Alexandre Graham Bell*

## RESUMO

Nas últimas duas décadas, especial atenção tem sido dada a contaminação ambiental por fármacos. Classificados como poluentes ambientais de preocupação emergente, estas substâncias apresentam considerável potencial de indução a efeitos biológicos adversos, especialmente em ecossistemas aquáticos. A presença dessas substâncias no ambiente aquático pode interferir significativamente na fisiologia, metabolismo e comportamento das espécies, sendo de extrema importância o conhecimento dos possíveis danos ambientais causados por estas substâncias. O presente trabalho teve como objetivo estimar a concentração de fármacos antirretrovirais (ARVs) utilizados no tratamento de HIV/AIDS nas águas superficiais no entorno do emissário submarino de Santos, litoral do Estado de São Paulo, bem como avaliar os possíveis efeitos biológicos adversos por meio de ensaios de toxicidade para avaliação de efeitos agudo e crônico, empregando como organismo modelo o ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*). Foram calculadas as concentrações ambientais estimadas (CAE) para treze antirretrovirais, de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006). Foram realizados ensaios de toxicidade aguda e crônica para três antirretrovirais selecionados: atazanavir (ATZ), efavirenz (EFV) e nevirapina (NEV), de acordo com os protocolos da USEPA (2002) e a norma ABNT NBR 15350 (2012). Os resultados obtidos no presente estudo revelaram valores de CAE superiores ao limite (0,01 µg/L) imposto pela diretriz da EMEA (CHMP, 2006) para 92,3% dos ARVs estudados. Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda demonstraram valores médios de  $Cl_{50}$  de 73,04 mg/L para ATZ; 11,46 mg/L para EFV; 84,61 mg/L para NEV, sendo então os três fármacos classificados como “nocivos” de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Na avaliação do efeito crônico, foram observados valores médios de CEO, CENO e  $Cl_{50}$  respectivamente de 0,78 mg/L, 0,39 mg/L e 0,63 mg/L para o ATZ; 0,195 mg/L, 0,0975 mg/L e 0,52 mg/L para o EFV; 0,39 mg/L, 0,195 mg/L e 0,97 mg/L para a NEV, sendo as três substâncias classificadas como “muito tóxico”, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Os dados obtidos poderão fornecer subsídios para avaliações de risco ambiental e para a adoção de programas governamentais e regulamentação desses fármacos que visem o monitoramento dos níveis desses fármacos em Estações de Tratamento de Efluentes e corpos receptores, buscando soluções que propiciem a redução/eliminação da carga poluidora em ecossistemas costeiros e marinhos.

**Palavras Chave:** Antirretrovirais, Avaliação ecotoxicológica, Fármacos no ambiente; *Echinometra lucunter*, Concentração Ambiental Estimada.

## ABSTRACT

In the last two decades, special attention has been given to environmental contamination by drugs. Classified as environmental pollutants of emerging concern, these substances have considerable potential for inducing adverse biological effects, especially in aquatic ecosystems. The presence of these substances in the aquatic environment can significantly interfere in the physiology, metabolism and behavior of the species, being extremely important the knowledge of the possible environmental damages caused by these substances. The present study aimed to estimate the concentration of antiretroviral drugs (ARVs) used in the treatment of HIV / AIDS in the surface waters around the Santos submarine outfall, on the coast of the State of São Paulo, as well as to evaluate the possible adverse biological effects through of toxicity tests to evaluate acute and chronic effects, using the sea urchin (*Echinometra lucunter*) as a model organism. Predicted Environmental Concentration (PEC) were calculated for thirteen antiretrovirals, according to the EMEA guideline (CHMP, 2006). Acute and chronic toxicity tests were performed for three selected antiretrovirals: atazanavir (ATZ), efavirenz (EFV) and nevirapine (NEV), according to the USEPA protocols (2002) and the ABNT NBR 15350 (2012) standard. The results obtained in the present study revealed PEC values above the limit (0.01 µg / L) imposed by the EMEA guideline (CHMP, 2006) for 92.3% of the studied ARVs. The results of the acute toxicity tests demonstrated mean IC<sub>50</sub> values of 73.04 mg / L for ATZ; 11.46 mg / L for EFV; 84.61 mg / L for NEV, so the three drugs are classified as “harmful” according to Directive 93/67 / EEC. In the evaluation of the chronic effect, mean values of CEO, CENO and IC<sub>50</sub>, respectively, were 0.78 mg / L, 0.39 mg / L and 0.63 mg / L for ATZ; 0.195 mg / L, 0.0975 mg / L and 0.52 mg / L for EFV; 0.39 mg / L, 0.195 mg / L and 0.97 mg / L for NEV, the three substances being classified as “very toxic”, according to Directive 93/67 / EEC. The data obtained may provide subsidies for environmental risk assessments and for the adoption of governmental programs and regulation of these compounds aimed at monitoring the levels of these drugs in Effluent Treatment Plants and receiving bodies, seeking solutions that provide for the reduction / elimination of the load. pollutant in coastal and marine ecosystems.

**Keywords:** Antiretrovirals, ecotoxicological assessment, drugs in the environment; *Echinometra lucunter*, Predicted Environmental Concentration

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente.....	3
Figura 2 - Taxa de detecção de indivíduos contaminados por HIV (Brasil, 2019b). ....	5
Figura 3 - Quantidade de ARVs dispensados/consumidos nas cidades de Santos e São Vicente no ano de 2017. ....	17
Figura 4 - Dose diária definida para os principais ARVs dispensados anualmente nos municípios de Santos e São Vicente. ....	18
Figura 5 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de atazanavir. ....	20
Figura 6 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de efavirenz. ....	21
Figura 7 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de nevirapina. ....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação baseada na diretiva 93/67/CEE da União Europeia. ....	4
Tabela 2 - Características físico-químicas estimadas dos principais antirretrovirais. ....	7
Tabela 3 - Características físico-químicas dos fármacos atazanavir, efavirenz e nevirapina.....	13
Tabela 4 - Valores de F <sub>pen</sub> e CAE para os principais ARVs. ....	18
Tabela 5 - Controle positivo de solvente Dimetilsulfóxido DMSO. ....	19
Tabela 6 - Resultados dos ensaios de toxicidade aguda com os medicamentos antirretrovirais empregando <i>Echinometra lucunter</i> .....	20
Tabela 7 - Resultados dos ensaios de toxicidade crônica com os medicamentos antirretrovirais empregando <i>Echinometra lucunter</i> .....	22
Tabela 8 - Comparativo dos valores de CAE e CI <sub>50</sub> (ensaio agudo) dos ARVs. ....	25
Tabela 9 - Comparativo dos valores de CAE e CI <sub>50</sub> (ensaio crônico) dos ARVs.....	26
Tabela 10 - Classificação dos fármacos atazanavir, efavirenz e nevirapina baseado na diretiva 93/67/CEE da União Europeia.....	27
Tabela 11 - Metabolismo humano dos antirretrovirais.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	–	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS	–	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	–	Antirretrovirais
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	–	Atazanavir
CAE	–	Concentração Ambiental Estimada
CENO	–	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	–	Concentração de Efeito Observado
CETESB	–	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	–	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDD	–	Dose Diária Definida
DDT	–	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DMSO	–	Dimetilsufóxido
EMEA	–	Agência Européia de Medicamentos
EFV	–	Efavirenz
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
Fpen	–	Fator de penetração no mercado
HAART	–	Terapia Antiretroviral Altamente Ativa
HIV	–	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia
LAI	–	Lei de Acesso à Informação
NBR	–	Norma Técnica Brasileira
NEV	–	Nevirapina
PEC	–	Predicted Environmental Concentration
POAS	–	Processos Oxidativos Avançados
POP	–	População

## LISTA DE SÍMBOLOS

- Cl<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Média
- K<sub>ow</sub> – Coeficiente de partição (octanol/água)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Fármacos no meio ambiente</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Medicamentos Antirretrovirais</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Estudos ecotoxicológicos no controle ambiental</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE)</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2 Substâncias-teste</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3. Avaliação ecotoxicológica</b> .....	<b>14</b>
3.3.1 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo .....	15
3.3.2 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico .....	15
<b>3.4 Análise estatística</b> .....	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. Cálculo da Concentração Ambiental Estimada – CAE</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 Controle positivo de solvente Dimetilsufóxido DMSO</b> .....	<b>19</b>
<b>4.3 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico</b> .....	<b>20</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>7. TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento humano vem influenciando e interferindo nos processos naturais de forma que a humanidade tem exercido um forte domínio sobre o meio ambiente para satisfazer as suas necessidades. O aumento da densidade demográfica e o desenvolvimento industrial e tecnológico dos últimos anos vêm ocupando os espaços desordenadamente com a exploração dos recursos naturais de forma intensiva, sem a devida preocupação com os impactos gerados pelos seus atos (CASARIN, 2011).

Uma das consequências desse avanço é a poluição direta e indireta do ambiente marinho. Dentre as principais fontes de poluição deste ambiente, podemos destacar o despejo de efluentes industriais e domésticos sem o devido tratamento ou controle de qualidade, perda e destruição das bacias de captação, a localização errônea de unidades industriais e práticas agrícolas deficientes (ABESSA *et al.*, 2005, MORAES e JORDÃO, 2002, MONTEIRO e BOXALL, 2010)

A síntese e o uso de substâncias químicas se difundiram pelo mundo, sem a devida preocupação com seus possíveis impactos. Os efeitos adversos dessas substâncias em longo prazo e risco potencial para a biota aquática se tornaram preocupantes a partir de 1960, principalmente após a publicação do livro Primavera Silenciosa (CARSON, 1962), o que deu início ao movimento ambientalista que deu início à consciência ecológica. Este foi o primeiro alerta sobre os possíveis efeitos ambientais dos praguicidas como o Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), sugerindo que a exposição do ambiente a este agente químico poderia causar declínio da população de algumas espécies de aves.

### 1.1 Fármacos no meio ambiente

Nas últimas duas décadas, especial atenção tem sido dada a contaminação ambiental por fármacos. Devido ao seu considerável potencial de indução a efeitos biológicos adversos, especialmente em ecossistemas aquáticos, esta classe de substâncias vem sendo classificada como poluente de preocupação emergente. (FENT *et al.*, 2006). Diversos pesquisadores passaram a investigar questões relacionadas à identificação e a quantificação desses poluentes em ecossistemas naturais, os efeitos fisiológicos em organismos não alvos, os seus produtos de

degradação e o desenvolvimento de tecnologias para remoção desses compostos em efluentes industriais (FATTA-KASSINOS, 2011; MERIC *et al.* 2011).

O termo Poluente de preocupação emergente refere-se a qualquer composto químico que pode ser encontrado em matrizes ambientais ou biológicas e que ainda não são monitorados, nem estão contemplados na legislação regulatória, mas apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente. Estão presentes numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, entre outros (SILVA e CONFORTI, 2013; PONTELLI *et. al.*, 2016).

Classificam-se como micropoluentes emergentes os fármacos e os agrotóxicos, amplamente utilizados nas lavouras brasileiras, os aceleradores de vulcanização, os repelentes, hormônios naturais e sintéticos, os compostos químicos presentes em produtos de higiene pessoal, de limpeza, e outros diversos produtos químicos utilizados hoje em dia pela sociedade, aumentando cada vez mais a sua quantidade no ecossistema aquático devido a sua ampla utilização (REIS *et al.*, 2007; SOARES e LEÃO, 2015).

Por apresentarem risco potencial à saúde dos seres humanos e ao meio ambiente, os efluentes que apresentam estas substâncias, devem receber tratamento adequado, evitando assim, problemas ambientais e de saúde pública. Nas últimas décadas o estudo de Processos Oxidativos Avançados (POAs) têm se destacado na pesquisa e desenvolvimento de tecnologias de tratamento de águas residuais, por se tratar de métodos eficientes que reduzem os impactos ambientais. A eficácia dos POAs depende da geração de radicais livres reativos, sendo o mais importante o radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ). Estes processos (como a química de Fenton, fotólise, fotocátalise, sonólise e as tecnologias de oxidação eletroquímica) têm sido aplicados com êxito para a remoção ou a degradação de poluentes recalcitrantes (ARAÚJO *et al.*, 2016).

A indústria farmacêutica se destaca como uma das maiores e mais lucrativas no mundo, arrecadando bilhões de reais anualmente (SOUZA, 2015). Produzidos em larga escala, os fármacos podem chegar aos ecossistemas aquáticos através do descarte inadequado em rede de esgoto e aterros sanitários, excreção humana, aplicação na medicina veterinária, efluentes hospitalares, dentre outros. O sistema de tratamento de esgoto convencional é ineficaz na remoção completa dos fármacos, que são inseridos continuamente em ambiente aquático (MONTEIRO e BOXALL, 2010).

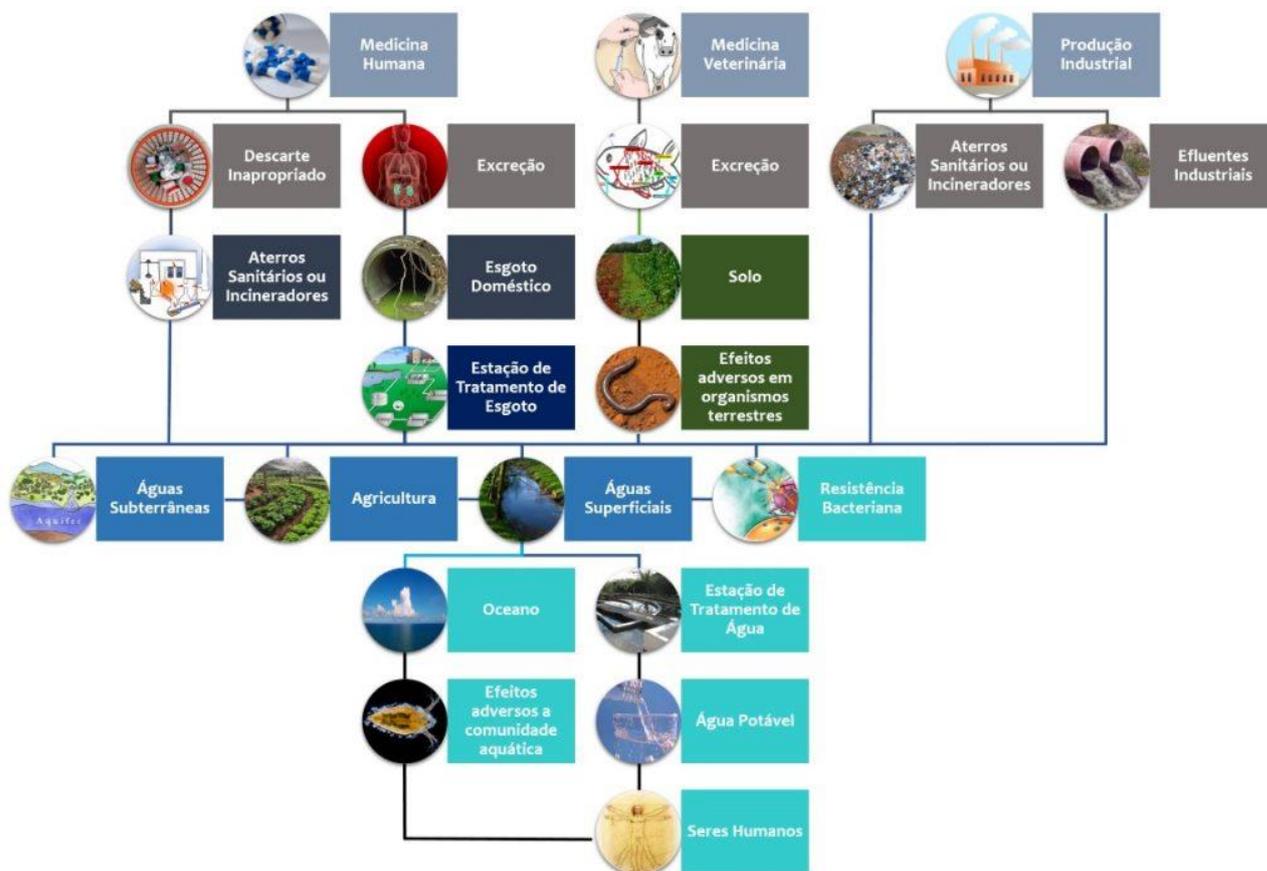


Figura 1 - Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente  
Fonte: O Eco

Estudos recentes mostraram que os processos de tratamento de efluentes não são suficientes para remover alguns produtos farmacêuticos. Em um estudo preliminar realizado na Espanha, Rodriguez et. al. (2003) utilizaram cromatografia gasosa com espectrômetro de massa para avaliar a eficiência de remoção química dos fármacos ibuprofeno e naproxeno, tendo obtido como resultado 65% e 45% respectivamente. Heberer (2002) verificou que os níveis de carbamazepina aumentavam consideravelmente após a descarga de efluentes em um canal em Berlim. Ferrari et. al. (2003) detectaram carbamazepina em efluentes de esgoto alemão com concentração entre 0,87 a 1,20 µg/L e eficiência de remoção de apenas 7%.

Devido a frequente detecção em matrizes ambientais, como solos, efluentes, águas superficiais e subterrâneas, sedimentos e biota, os fármacos têm sido foco de diversas pesquisas sobre o seu destino e efeito à biota (MONTEIRO e BOXALL, 2010; JUNIOR *et al.*, 2014). Embora diversos autores que identificaram e quantificaram esses poluentes não tenham detectado concentrações elevadas o suficiente para

ocorrência de efeito agudo no ambiente, há evidências de que estes compostos estejam presentes em concentrações suficientes para causar efeitos crônicos na biota (CRANE *et al.*, 2006).

O impacto ambiental de tais substâncias têm sido descrito como sendo semelhante ao de pesticidas, principalmente porque os fármacos são desenvolvidos para apresentar caráter de resistência, sendo usualmente lipofílicos e frequentemente apresentam uma baixa biodegradação (SPONCHIADO, 2008). Esta propriedade intrínseca faz com que estes tenham um maior potencial de bioacumulação e persistência no ambiente (CHRISTENSEN, 1998).

Outro problema relacionado à presença de fármacos no ambiente é o desenvolvimento da resistência microbiana. A pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos nos efluentes hospitalares propicia a disseminação de linhagens resistentes (MEIRELES, 2008). Estima-se que 55% de todos os microrganismos apresentem resistência a pelo menos um antibiótico (RODRIGUES, 2009).

O Parlamento Europeu e o Conselho da Comunidade Europeia elaboraram um sistema integrado sobre o registro, autorização, avaliação e restrição de substâncias químicas denominadas REACH. Esse sistema criou a Agência Europeia de Produtos Químicos (ABIQUIM, 2007). Conforme estabelece mencionada legislação, os dados obtidos em estudos de toxicidade podem ser interpretados de acordo com a Diretiva 93/67/CEE, a qual classifica as substâncias químicas de acordo com as concentrações de efeito estimadas (QUINN *et al.*, 2008). As substâncias químicas podem ser classificadas como extremamente tóxico, muito tóxico, tóxico, nocivo e não tóxico (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação baseada na diretiva 93/67/CEE da União Europeia.

<b>Não tóxico</b>	<b>Nocivo</b>	<b>Tóxico</b>	<b>Muito tóxico</b>	<b>Extremamente tóxico</b>
mg.L <sup>-1</sup>				
Cl <sub>50</sub> > 100	Cl <sub>50</sub> entre 10 e 100	Cl <sub>50</sub> entre 1,0 e 10	Cl <sub>50</sub> entre 0,1 e 1,0	Cl <sub>50</sub> < 0,1

Fonte: Quinn *et al.*, 2008

LIMITES EMEA para FASE II (avalição ECOTOX)

## 1.2 Medicamentos Antirretrovirais

Os antirretrovirais surgiram no final da década de 1980, quando houve um evento sociocultural marcado pelo aparecimento de uma epidemia que rapidamente se alastrou e se disseminou pelos cinco continentes: A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Infecção causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo a subclasse do HIV-1 e do HIV-2 responsáveis por essa Síndrome, que tem como principal característica o comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro (BROOKS, 2000).

Segundo dados do UNAIDS (2019), aproximadamente 37.1 milhões de pessoas no mundo viviam com HIV / AIDS em 2018. De acordo com os números publicados pelo Ministério da Saúde e SINAN, de 1980 até junho de 2019, foram registrados no Brasil um total de 966.058 casos de contaminação pelo vírus HIV, havendo uma predominância de casos nas regiões sudeste e sul.

No período que compreende os anos de 2007 a 2018, o município de Santos apresentou uma taxa de detecção de casos de AIDS superior ao município de São Paulo e também superior à média do sudeste (Figura 2) (BRASIL, 2019b).



Figura 2 - Taxa de detecção de indivíduos contaminados por HIV (Brasil, 2019b).  
Fonte: MS/SVS/DCCI – Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis

Em relação ao contexto da infecção pelo HIV, percebe-se que as evoluções técnico-científicas e, principalmente farmacológicas, têm oportunizado aos indivíduos com AIDS um viver com a doença, e não para a doença como nos anos iniciais; isto é, o tratamento antirretroviral, essencialmente após o desenvolvimento da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART), tem possibilitado, entre outros aspectos, transformar uma síndrome que anteriormente era percebida culturalmente como um

resultado de morte anunciada em uma doença com perspectivas de cronicidade (BRASIL, 2006).

Desde 1996, o Brasil distribui gratuitamente pelo SUS (Sistema Único de Saúde) o coquetel anti-aids para todos que necessitam do tratamento. Segundo dados de dezembro de 2018, 353 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença, sendo que o Ministério da Saúde estima que cerca de 966 mil pessoas vivam com HIV/Aids no Brasil. Atualmente, existem 22 medicamentos divididos em cinco classes (BRASIL, 2019a).

Conforme Rang *et al.* (2011) medicamentos antirretrovirais, principalmente o anti-VIH podem ser classificados em diferentes classes, baseado no estágio do ciclo de vida viral que eles atuam:

i. Inibidores da transcriptase reversa (análogos e não-análogos da TR) bloqueiam a atividade da enzima transcriptase reversa, impedindo assim a construção do DNA viral (exs. Zidovudina, Lamivudina e Efavirenz);

ii Inibidores da protease, incluindo o Saquinavir, Lopinavir e Nelfinavir, interferem com a montagem viral, bloqueando a enzima protease necessária para clivar as proteínas para a montagem final em novas cópias de vírus;

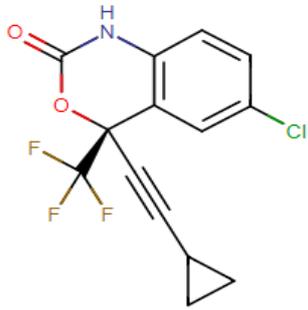
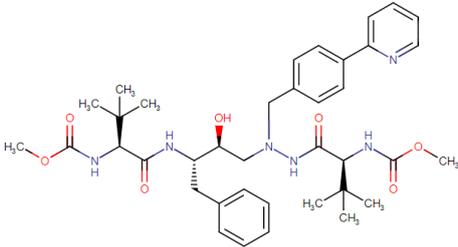
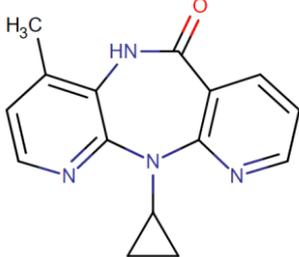
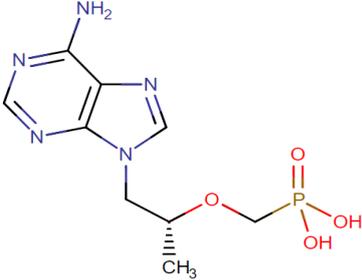
iii. Inibidores da fusão (ex. Enfuvirtida) bloqueiam a fusão do vírus com a membrana celular e subsequente entrada em células do hospedeiro;

iv. inibidores da integrase (ex. Raltegravir) bloqueiam a integração do DNA viral no DNA da célula hospedeira;

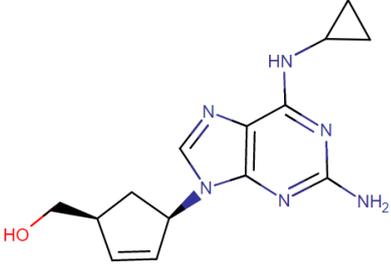
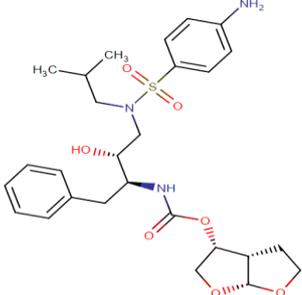
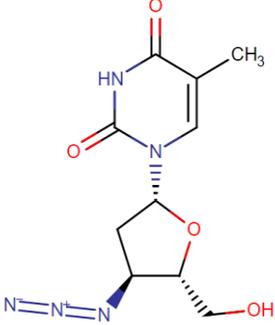
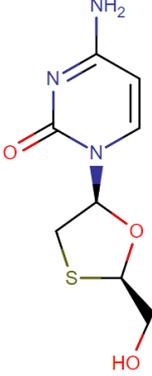
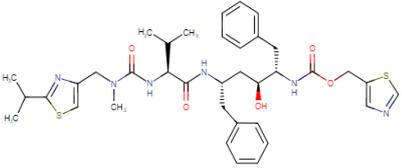
v. Inibidores de Entrada (ex. Maraviroc) ligam-se a receptores CCR5, um co-receptor na superfície da membrana viral utilizado na entrada do vírus na célula hospedeira.

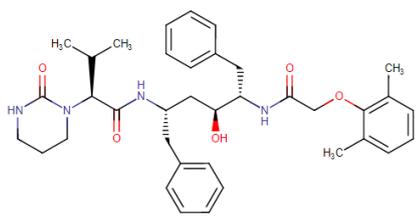
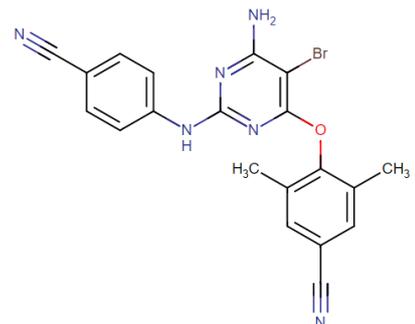
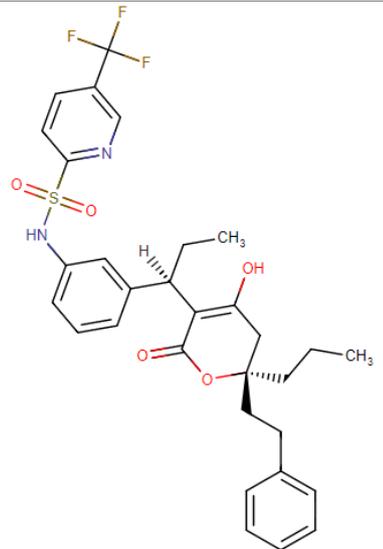
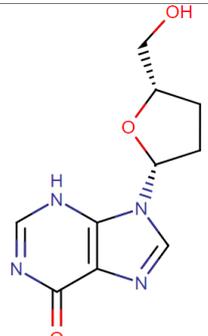
Para que seja possível entender os mecanismos dos possíveis efeitos tóxicos dos medicamentos no ambiente, é importante conhecer suas características físico-químicas. A Tabela 2 descreve as principais características físico-químicas de alguns fármacos antirretrovirais, conforme descrito no Drug Bank.

Tabela 2 - Características físico-químicas estimadas dos principais antirretrovirais.

Fármaco	Solubilidade (H <sub>2</sub> O)	pKa	Log K <sub>ow</sub>	Estrutura
Efavirenz	0.00855 mg/mL	12.52 (s.a.) -1.5 (s.b.)	4.46	
Atazanavir	4-5 mg/mL	11.92 (s.a.) 4.42 (s.b.)	4.54	
Nevirapina	0,105 mg/mL	10.37 (s.a.) 2.49 (s.a.)	2.5	
Tenofovir	1.87 mg/mL	1.35 (s.a.) 3.74(s.b.)	-1.5	

continua

Fármaco	Solubilidade		Log Kwo	Estrutura
	(H <sub>2</sub> O)	pKa		
Abacavir	1.21 mg/mL	15.41 (s.a.) 5.77 (s.b.)	0,61	
Darunavir	0.0668 mg/mL	13.59 (s.a.) 2.39 (s.b.)	1.76	
Zidovudina	11.3 mg/mL	9.96 (s.a.) -3.0 (s.b.)	-0.3	
Lamivudina	70 mg/ml	14.29 (s.a.) 0.16 (s.b.)	-1.1	
Ritonavir	0.00126 mg/mL	13.68 (s.a.) 2.84 (s.b.)	5.22	

Lopinavir	0.00192 mg/mL	13.39 (s.a.) -1.5 (s.b.)	4.69	
Etravirina	0.0169 mg/mL	12.49 (s.a.) 4.13 (s.b.)	5.54	
Tipranavir	0.000205 mg/mL	5.92 (s.a.) -3.3 (s.b.)	7.14	
Didanosina Entérica	15.8 mg/mL	6.94 (s.a.) 2.75 (S.b.)	-0.35	

<sup>1</sup> Fonte: Drugbank  
s.a., strongest acid; s.b., strongest base

Assim como a maioria dos fármacos, os antirretrovirais podem sofrer biotransformação no organismo humano. Esse processo consiste em reações químicas que modificam a estrutura das moléculas que foram administradas, o que, em geral, resulta em mudanças nas propriedades físico-químicas e farmacodinâmicas, resultando em redução ou aumento da atividade biológica e/ou aumento da solubilidade em água, com o intuito de facilitar a sua excreção (especialmente pela via urinária). No entanto, existem casos em que a metabolização se dá de maneira incompleta, resultando em taxas de excreção que variam de 0 a 100% (KÜMMERER, 2008).

Existem duas fases importantes do metabolismo de fármacos: (i) Fase I que gera metabólitos a partir do fármaco ativo, através de reações de hidrólise, oxidação, redução, alquilação e desalquilação; (ii) Fase II que gera metabólitos modificados a partir de reações de conjugação (ex. glicuronilação e sulfatação), para a formação de compostos mais hidrossolúveis e de maior peso molecular, aumentando a taxa de excreção destas moléculas (KÜMMERER, 2008).

Sendo assim, os fármacos podem ser encontrados no ambiente de forma inalterada ou biotransformados, sendo que estes metabólitos também merecem atenção especial, uma vez que a presença dos produtos resultantes do metabolismo pode acarretar em diferentes efeitos biológicos tóxicos em organismos não alvos, especialmente organismos aquáticos, uma vez que são expostos aos resíduos. Apesar dos estudos que abordam as questões dos efeitos tóxicos de fármacos em organismos marinhos por meio de ensaios ecotoxicológicos, e as quantificações destes em matrizes ambientais, poucos e esparsos são os dados na literatura relativos à classe dos antirretrovirais (PRASSE *et al.*, 2010, WOOD *et al.*, 2016).

### **1.3 Estudos ecotoxicológicos no controle ambiental**

Diversos ensaios, que possuem ênfase nas respostas biológicas dos organismos para a avaliação da qualidade dos ecossistemas, têm sido desenvolvidos. Nesse contexto, a Ecotoxicologia estuda os efeitos dos contaminantes sobre os seres vivos e os ecossistemas, alertando para os riscos de substâncias químicas e sugerindo a aplicação de medidas preventivas de graves danos aos ecossistemas naturais (NEWMAN, 2002).

Os estudos ecotoxicológicos podem avaliar os efeitos agudos e crônicos da

exposição dos seres vivos a estes agentes. Sendo assim, devem ser realizadas avaliações de seus efeitos em diferentes organismos, em diferentes matrizes (água, sedimento etc.) para se produzir dados suficientes para avaliações de risco (CINIGLIA *et al.*, 2005).

Várias espécies de organismos vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos e corpos receptores. Dentre os principais organismos, utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se os representantes do Filo Echinodermata, principalmente os membros da Classe *Echinoidea* (ouriços-do-mar) (ABNT 15.350, 2012).

Para a escolha do organismo-teste é importante selecionar modelos de significativa representação ecológica dentro das biocenoses, com cosmopolização da espécie, estabilidade genética e uniformidade das populações, baixo índice de sazonalidade e sensibilidade constante e apurada. Além disso, se faz necessário o conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares destes, além de se considerar o tipo de teste a ser realizado (RANG, 1995).

Os ouriços-do-mar (*Echinometra lucunter*) são considerados bons bioindicadores ambientais por terem alta sensibilidade às mudanças que ocorrem no ambiente. A utilização de suas larvas e gametas vem sendo amplamente explorada por pesquisadores desde que descrito por Kobayashi (1971), por ser considerada a fase crítica para o crescimento normal, na qual há maior sensibilidade para detectar alterações em ambientes marinhos (NASCIMENTO, 1999; MAZO, 2004; BELLAS, 2007, VEZZONE, 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo estimar a concentração dos fármacos antirretrovirais abacavir, atazanavir, darunavir, didanosina entérica, efavirenz, etravirina, lamivudina, lopinavir, nevirapina, ritonavir, tenofovir, tripanavir e zidovudina, no entorno do emissário submarino, bem como avaliar os efeitos biológicos adversos por meio de ensaios de toxicidade, empregando ouriços-do-mar (*Echinometra*

*lucunter*) como organismo teste.

## 2.2 Objetivos específicos

- Estimar as concentrações dos fármacos antirretrovirais das classes dos inibidores da transcriptase reversa e protease em águas superficiais marinhas da baía de Santos através do cálculo da Concentração Ambiental Estimada - CAE;
- Estimar a toxicidade dos fármacos Efavirenz, Nevirapina e Atazanavir em ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*), por meio de ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo e crônico;
- Estimar os valores de efeito observados (CI<sub>50</sub>, CENO e CEO).

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE)

Foi realizada uma avaliação, com objetivo de obter uma estimativa da exposição para a seleção dos fármacos com maior potencial de toxicidade, a fim de selecionar quais seriam destinados aos estudos para avaliação dos efeitos agudo e crônico. Para isso, se verificou o valor do CAE utilizando como limite 0,01 µg/L imposto pela EMEA (2006). Substâncias que apresentaram valores abaixo deste foram assumidos como representantes de baixo risco ao meio ambiente. No entanto, foram selecionados para a realização de avaliação de destino e efeito ambiental, três fármacos (atazanavir, efavirenz e nevirapina) que apresentaram valores superiores a esse limite (EMEA, 2006).

Os estudos para avaliação do efeito ambiental foram divididos em Nível A, no qual foi realizada uma pré-avaliação com base em dados ecotoxicológicos e no risco, e Nível B, onde foi realizado o estudo da substância e do compartimento específico com base em um conjunto de dados estendidos em emissão, destinos e efeitos do fármaco (GRUNG *et al.*, 2008).

O cálculo da CAE das águas superficiais foi realizado de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006), através da seguinte equação (1):

$$\text{CAE \u00e1guas superficiais} = \frac{\text{Dose m\u00e1xima consumida por habitante(mg)} \times \text{Fpen}}{\text{res\u00edduos l\u00edquidos (L)/habitante} \times \text{fator de dilui\u00e7\u00e3o}} \quad (1)$$

Sendo que:

Fpen = fator de penetra\u00e7\u00e3o no mercado

O Fpen (CHPM, 2006), foi calculado de acordo com a equa\u00e7\u00e3o (2):

$$\text{Fpen [\%]} = \frac{\text{consumo (mg/ano)} \times 100}{\text{DDD (mg/dxhab)} \times \text{Pop} \times 365 \text{ dias}} \quad (2)$$

Sendo que:

DDD = dose di\u00e1ria definida (segundo OMS)

Pop = n\u00famero de habitantes da cidade

As informa\u00e7\u00f5es referentes ao n\u00famero de medicamentos dispensados foram obtidas atrav\u00e9s de acesso ao site do Governo Federal (<http://www.acessoainformacao.gov.br/>), onde atrav\u00e9s da Lei de Acesso \u00e0 Informa\u00e7\u00e3o (LAI) n\u00b0 12.527/2011, foi solicitada a sa\u00edda anual dos medicamentos antirretrovirais dispensados nos munic\u00edpios de Santos e S\u00e3o Vicente, que s\u00e3o as cidades que possuem o esgoto pr\u00e9-condicionado pelo Emiss\u00e1rio Submarino de Santos. Dados referentes \u00e0 gera\u00e7\u00e3o de res\u00edduos l\u00edquidos foram levantados juntamente \u00e0s publica\u00e7\u00f5es dispon\u00edveis online da SABESP e CETESB.

### 3.2 Subst\u00e2ncias-teste

Tr\u00eas subst\u00e2ncias foram selecionadas para a realiza\u00e7\u00e3o dos ensaios de toxicidade para avalia\u00e7\u00e3o dos efeitos agudo e cr\u00f4nico, conforme descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracter\u00edsticas f\u00edsico-qu\u00edmicas dos f\u00e1rmacos atazanavir, efavirenz e nevirapina

<b>Caracter\u00edsticas</b>	<b>Atazanavir</b>	<b>Efavirenz</b>	<b>Nevirapina</b>
Fabricante	Nortec qu\u00edmica S.A.	Nortec qu\u00edmica S.A.	Farmanguinhos Fiocruz
Caracteriza\u00e7\u00e3o qu\u00edmica	Sulfato de atazanavir	Efavirenz	Nevirapina
N\u00famero CAS	198904-31-3	154598-52-4	129618-40-2
F\u00f3rmula molecular	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O
Peso molecular	704,86 g/mol	315,68 g/mol	266,30 g/mol
Forma	P\u00f3 cristalino	P\u00f3 cristalino	P\u00f3 cristalino
Cor	Branco a amarelo	Branco ou rosado	Branco ou amarelo

Para a realização dos ensaios foi necessário adicionar DMSO em até 3% da solução final para a solubilização dos fármacos, considerando a baixa solubilidade destes em água. Foram realizados ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos com o grupo controle DMSO 3%.

### 3.3. Avaliação ecotoxicológica

Foram realizados ensaios de toxicidade para avaliação dos efeitos agudo (taxa de fertilização) e crônico (desenvolvimento embriolarval) utilizando ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*), com três dos fármacos que apresentaram concentrações ambientais previstas acima de 0,01 µg/L (atazanavir, nevirapina e efavirenz), conforme a EMEA (2006).

Os organismos foram coletados através de mergulho livre, na Ilha das Palmas, no município de Guarujá, São Paulo, armazenados em caixa térmica, recobertos com algas do gênero *Ulva sp.*, mantendo as condições de temperatura até o seu transporte ao laboratório, onde foram mantidos em um tanque, sob forte aeração e condições ideais para estes organismos até o momento da realização dos ensaios.

A água utilizada nos tanques é natural, originalmente coletada na Ilha das Palmas. Para manutenção destes organismos, seus parâmetros físico-químicos, tais como temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram diariamente observados, obedecendo as condições ideais, conforme a norma NBR 15350 (ABNT, 2012).

Para a diluição das substâncias-teste, manuseio dos gametas e preparação do controle, foi utilizada água reconstituída, a partir da mistura de sal comercial da marca CORAL PRO SALT (RED SEA®) em água processada, mantida sob agitação para solubilização total e preservação das características encontradas no ambiente natural dos organismos. A solução foi filtrada, com auxílio de um suporte de filtração e membrana de celulose Millipore® de 0,45 µm e, a água mantida nos padrões físico-químicos conforme norma 15350 (pH entre 7,8 e 8,4 e salinidade entre 30 e 37(g/L)) (ABNT, 2012).

### 3.3.1 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo

Os ensaios de toxicidade para avaliação do efeito agudo são definidos como a avaliação de efeitos severos e rápidos resultantes da exposição do organismo-teste a substâncias químicas em um curto período. Esses critérios de avaliação normalmente se baseiam em função da mortalidade e da imobilidade do organismo-teste (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006; MAGALHÃES e FILHO, 2008). As avaliações de efeitos agudos são importantes para evidenciar os efeitos letais em curtos intervalos de tempo, fornecendo dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental (FONSECA, 1991).

Neste estudo, espermatozoides de ouriço-do-mar foram expostos a diferentes concentrações (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L) dos fármacos a serem testados (atazanavir, nevirapina e efavirenz) durante o período de 1 hora. Após este período, a solução contendo óvulos foi adicionada aos frascos-teste. Vinte minutos após a adição dos óvulos, o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 mL de formol tamponado com bórax em todas as réplicas. Os procedimentos foram baseados no protocolo USEPA (2009), adaptado para a espécie *Echinometra lucunter*.

Após o período de exposição, o ensaio foi encerrado com a adição de formol tamponado. Posteriormente foi realizada a leitura e estimada a concentração de efeito.

Ao final do ensaio, as larvas foram divididas em dois grupos conforme seu aspecto morfológico, para identificação das larvas normais e anormais. A leitura do ensaio foi realizada através de contagem dos 100 primeiros organismos conforme o estágio de desenvolvimento. Nestes ensaios, os resultados são expressos como  $CI_{50}$  (concentração inibitória média) (ABNT, 2012).

### 3.3.2 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico

Os ensaios de toxicidade para avaliação do efeito crônico são úteis na avaliação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por período que varia desde 1/10 do ciclo vital até à totalidade da vida do organismo (APRANGUE, 1973; RAND, 1980; RAND e PETROCELI, 1985). De modo geral, porém não exclusivo, esses efeitos são sub-letais e observados em situações em que as concentrações do agente tóxico, às quais ficam expostos os organismos, permitem sua sobrevivência, mas afetam uma ou várias de

suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e comportamento em geral.

No ambiente aquático, observam-se os efeitos crônicos, quando os efluentes industriais tratados são lançados continuamente nos corpos receptores. Dessa forma, os organismos são desafiados em um ambiente cronicamente contaminado, ocasionando efeitos crônicos a níveis sub-letais ou letais ao longo do tempo (STEPHAN e MOUNT, 1973).

Neste estudo, embriões recém-fertilizados de ouriço-do-mar foram expostos a diferentes concentrações (0,195, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/L) dos fármacos a serem testados (atazanavir, nevirapina e efavirenz) durante o período de desenvolvimento embrionário, ou seja, de 36h a 42h para *Echinometra lucunter*, de acordo com a norma técnica ABNT/NBR 15350 (2012). Ao final do ensaio, as larvas foram divididas em dois grupos conforme seu aspecto morfológico, para identificação das larvas normais e anormais. A leitura do ensaio foi realizada através de contagem dos 100 primeiros organismos conforme o estágio de desenvolvimento.

Os estudos para avaliação de efeito crônico normalmente são empregados nas fases mais sensíveis do ciclo de vida dos organismos-teste, ou seja, nas fases embrionária e larval (ADAMS e ROWLAND, 2002). Nestes ensaios, os resultados são expressos como  $CI_{50}$  (concentração inibitória média), CENO (a maior concentração que não causa efeito ao organismo-teste) e CEO (menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo aos organismos-teste) (ABNT, 2012).

### **3.4 Análise estatística**

Após os experimentos, foi possível empregar diferentes métodos estatísticos para calcular a concentração mediana causadora de efeito adverso em 50% dos organismos expostos durante o período de ensaio, sendo os valores de toxicidade expressos em  $CI_{50}$  (concentração inibitória média), calculada por interpolação linear utilizando o programa ICPin.

Os resultados dos ensaios crônicos, após passarem nos pré-requisitos para aplicação da análise de variância (ANOVA), foram empregados o teste de *Dunnett*, utilizando o software Prisma, a fim de identificar as concentrações que apresentaram diferença estatística significativa com o controle. Para todas as análises diferenças significativas foram determinadas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cálculo da Concentração Ambiental Estimada – CAE

Os cálculos da CAE foram empregados para treze fármacos com base em dados do Ministério da Saúde (2018), referentes à quantidade anual de ARVs dispensada nos municípios de Santos e São Vicente, no período de julho de 2017 a julho de 2018 conforme apresentados na Figura 3. A Figura 4 mostra a Dose Diária Definida (DDD) para estes fármacos.

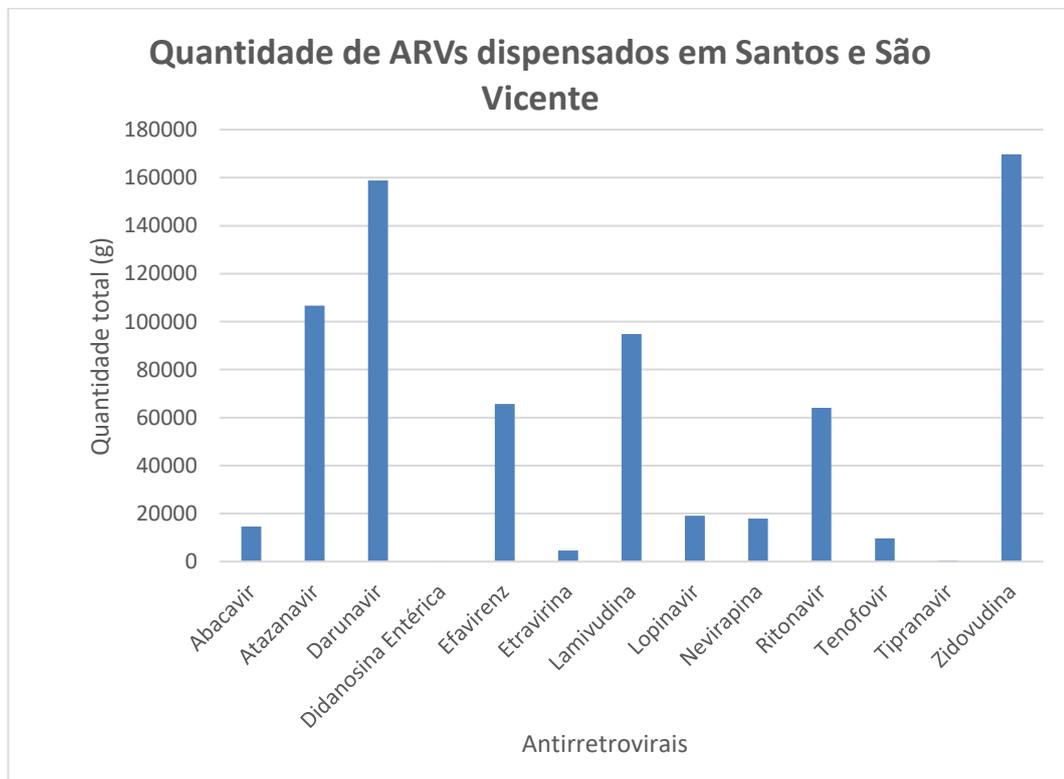


Figura 3 - Quantidade de ARVs dispensados/consumidos nas cidades de Santos e São Vicente no ano de 2017.

Fonte: Brasil<sup>2</sup> (2018)

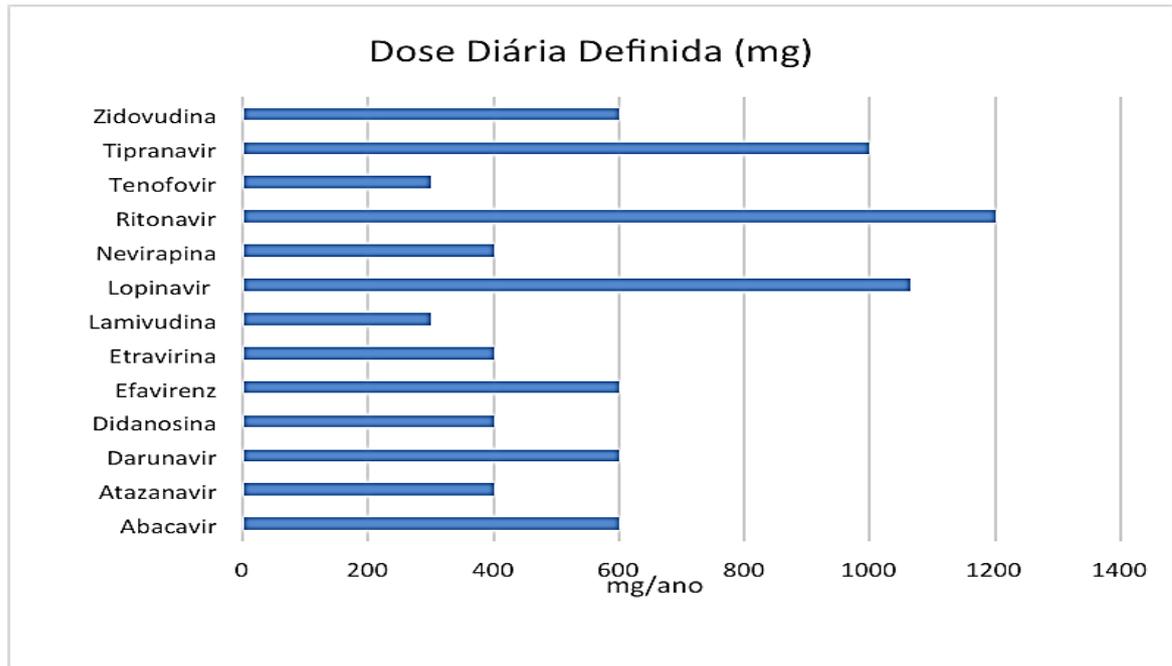


Figura 4 - Dose diária definida para os principais ARVs dispensados anualmente nos municípios de Santos e São Vicente.  
Fonte: Brasil<sup>2</sup> (2018)

Segundo dados do IBGE (2018), a população de Santos em 2018 era de 432.957 habitantes, e a população de São Vicente de 363.173 habitantes, totalizando 796.130 habitantes. Conforme a Sabesp (2018), a quantidade de resíduos líquidos/habitante/dia é de 575 L. O fator de diluição utilizado é de 10, obtendo os seguintes valores de Fpen e CAE.

Tabela 4 - Valores de Fpen e CAE para os principais ARVs.

Antirretroviral	Fpen (%)	CAE µg/L
Didanosina Entérica	2,064780500	0,001436
Tipranavir	0,00018583	0,032318
Etravirina	0,003923088	0,27291
Tenofovir	0,011051751	0,576613
Abacavir	0,008388525	0,875324
Nevirapina	0,015434252	1,073687
Lopinavir	0,006170718	1,143997
Ritonavir	0,01837132	3,834015
Efavirenz	0,037645122	3,928187
Lamivudina	0,10874833	5,673826
Atazanavir	0,091816852	6,387259
Darunavir	0,091082736	9,504285
Zidovudina	0,09736025	10,15933

\*Fpen = fator de penetração no mercado

\*CAE, concentração ambiental prevista

Fármacos que apresentaram valores abaixo do limite (0,01µg/L) foram assumidos como representantes de baixo risco ao meio ambiente. Entretanto, Atazanavir, Efavirenz e Nevirapina, fármacos com valores superiores, foram selecionados para a realização de avaliação de destino e efeito ambiental-do presente estudo.

#### 4.2 Controle positivo de solvente Dimetilsufóxido DMSO

Com o propósito de avaliação de possíveis efeitos nos organismos-teste relacionados ao solvente DMSO (3%) utilizado nas diluições do atazanavir, efavirenz e nevirapina, foi realizado um controle positivo do solvente com a maior concentração utilizada em cada ensaio. Os resultados demonstram que não houve diferença estatística significativa entre o controle de água e a maior concentração do solvente DMSO (Teste *t* de Student( $p \leq 0,05$ )) (Tabela 5).

Tabela 5 - Controle positivo de solvente Dimetilsufóxido DMSO.

<b>Tratamentos</b>	<b>Desenvolvimento embriolarval médio (%)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b><i>P</i></b>
<b>Avaliação de efeito agudo</b>			
Controle de água	98,25	3,0	-
DMSO 3%	97,5	1,5	0,110
<b>Avaliação de efeito crônico</b>			
Controle de água	97,5	3,2	-
DMSO 3%	96,75	1,25	0,122

#### 4.3 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo

Nos ensaios realizados para avaliação da toxicidade aguda (n=3) foram utilizadas as concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg/L, além dos controles (água e DMSO). A  $CI_{50}$  observada foi de 73,04 mg/L para o medicamento atazanavir, 11,46 mg/L para o medicamento efavirenz e 84,61 mg/L para a nevirapina conforme apresentado na Tabela 3.

Os dados de toxicidade aguda estão expressos como a média das concentrações

efetivas (CI<sub>50</sub> em mg/L) dos medicamentos Efavirenz, Nevirapina e Atazanavir estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios de toxicidade aguda com os medicamentos antirretrovirais empregando *Echinometra lucunter*.

Medicamento	CI <sub>50</sub> (mg/L)
Atazanavir	73,04 (1,06 – 0,86)
Efavirenz	11,46 (0,28 – 0,35)
Nevirapina	84,61 (3,82 – 4,74)

\*CI<sub>50</sub> = Concentração inibitória média (n=3)

#### 4.4 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico

Nos experimentos realizados para avaliação do efeito crônico (n=3), após a exposição dos embriões de ouriço-do-mar às diferentes concentrações de atazanavir (0,195, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/L), foram observados valores de CEO e CENO de 0,78mg/L e 0,039mg/L, respectivamente, conforme apresentado na Figura 5.

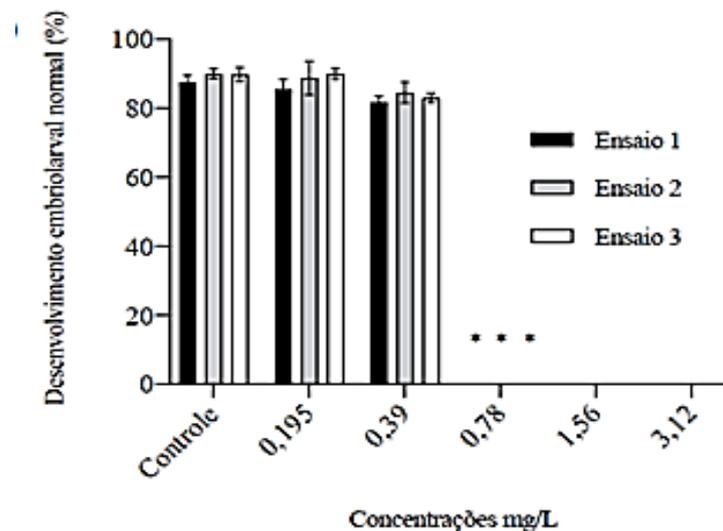


Figura 5 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de atazanavir.

Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: \*p<0.05

Em relação à exposição dos embriões de ouriço-do-mar ao efavirenz (n=3), utilizando as mesmas concentrações, para avaliação dos efeitos crônicos, o valor obtido para o CEO foi 0,195mg/L, enquanto o CENO foi de 0,0975mg/L, conforme

demonstrado na Figura 6.

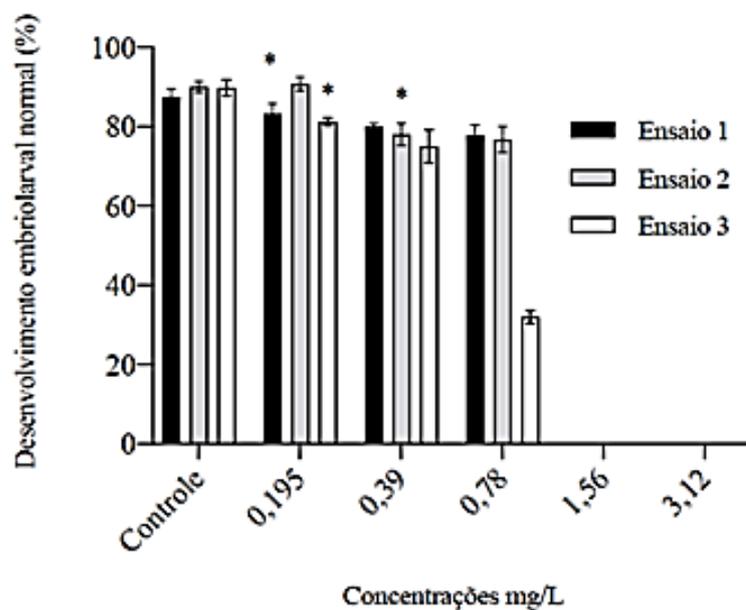


Figura 6 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de efavirenz.

Os valores expressados representam a média  $\pm$  erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: \* $p < 0.05$

A Figura 7 mostra os valores de CEO e CENO após a exposição dos organismos-teste (*E. lucunter*) ao fármaco nevirapina ( $n=3$ ), nas concentrações (0,195, 0,39, 0,78, 1,56 e 3,12 mg/L). Como observado, o valor de CEO foi 0,39 e o CENO 0,195 mg/L.

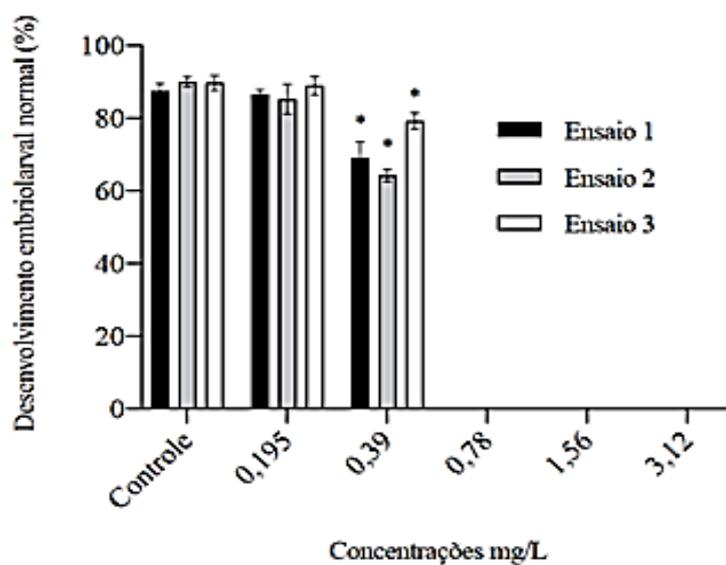


Figura 7 - Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de nevirapina. Os valores expressados representam a média  $\pm$  erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: \* $p < 0.05$

Tabela 7 - Resultados dos ensaios de toxicidade crônica com os medicamentos antirretrovirais empregando *Echinometra lucunter*.

Medicamento	CEO (mg/L)	CENO (mg/L)	CI <sub>50</sub> (mg/L)
Atazanavir	0,78	0,39	0,63 (0,62 – 0,64)
Efavirenz	0,195	0,0975	0,52 (0,50 – 0,53)
Nevirapina	0,39	0,195	0,97 (0,95 – 0,98)

\*CEO = Menor concentração de efeito observado

\*CENO= Concentração de efeito não observada

\*CI<sub>50</sub>= Concentração Inibitória Média

## 5. DISCUSSÃO

O governo federal brasileiro desenvolveu políticas públicas e protocolos para prevenção e controle da AIDS, dentre os quais podemos citar o fornecimento de coquetéis que devem ser utilizados, inclusive como profilaxia, para pacientes expostos a risco (BRASIL, 2016). Fármacos anti-HIV, como nucleosídeo e não nucleosídeo, inibidores da transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores de fusão, inibidores de entrada e inibidores de transferência de fita de integrase, são usados para tratar o HIV e para impedir transmissão vertical (MOFENSON, 2010).

O município de Santos tem implementado estas diretrizes, o que tem contribuído para a redução no número de novos casos, entretanto, a quantidade de ARVs dispensada ainda é considerável, como foi demonstrado nos dados referentes à dispensação obtidos (Brasil, 2018), o que torna extremamente relevante a realização de estudos sobre o impacto ambiental ocasionado por esta classe de fármacos.

Os micropoluentes vêm sendo foco de atenção por longa data. Nos últimos anos, este problema vem sendo agravado, devido ao crescente número de novos fármacos produzidos e consumidos, assim como a presença dos seus resíduos em diferentes ecossistemas (NIKOLAOU *et al.*, 2007; MOMPELAT *et al.*, 2009).

Devido à limitação das técnicas para remoção e identificação destes produtos no ambiente, se faz necessária a utilização de métodos, como o cálculo da CAE, para que seja possível a avaliação de risco. Oosterhuis (2012) demonstrou em seu trabalho a importância na avaliação dos dados nacionais e regionais de consumo dos fármacos para monitoramento ambiental. Pode-se argumentar que seria o método mais simples e seguro para aplicar o pior cenário possível, principalmente quando se trata de novas substâncias.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam um valor da CAE superior ao limite (0,01 µg/L) para 92,3% dos ARVs estudados, expondo a necessidade de monitoramento ambiental desta classe de fármacos que podem ser assumidos como representantes de alto risco ao meio ambiente. Sendo assim, se torna imprescindível a coleta de dados sobre o destino ambiental e a realização de testes ecotoxicológicos para exposição de curto e longo prazo.

Diversos estudos foram realizados a fim de investigar a correlação entre concentrações ambientais estimadas e mensuradas, como Bound (2006), que demonstrou em seu estudo haver uma pequena divergência entre as duas

concentrações e que essas variações podem estar relacionadas aos processos de tratamento envolvidos e das condições climáticas da região. Também é possível que metabólitos humanos, possam sofrer alterações, sendo hidrolisados durante o tratamento de águas residuais ou mesmo no meio ambiente (BOUND e VOULVOULIS, 2005). Apesar disso, os valores de CAE para os ARV estudados estão muito acima do limite (0,01 µg/L), o que torna irrelevante esta possível variação.

Os medicamentos, mesmo sendo utilizados com finalidade benéfica, podem interferir, em maior ou menor extensão, em uma variedade de espécies, alterando assim, algumas das suas biomoléculas e vias metabólicas essenciais que em última instância, podem resultar em danos agudos e/ou permanentes sobre essas espécies (SUMPTER, 2005).

Diversas pesquisas em ambientes aquáticos têm demonstrado que os fármacos antineoplásicos, hormônios sexuais e antibióticos, são capazes de causar efeitos biológicos adversos em organismos aquáticos (ZAPPAROLI et al, 2011). As consequências nocivas de restos de medicamentos têm sido verificadas analisando as biotas aquáticas.

No estudo realizado por Bila e Dezotti (2003), foram avaliados os efeitos do antibiótico sulfonamida na contaminação de um sistema terrestre com três espécies de plantas, fornecendo informações da alteração no desenvolvimento normal, crescimento e a bioacumulação em diferentes compartimentos da planta. Outros problemas observados foram as alterações da comunidade microbiana do solo, detectando o desenvolvimento de resistência bacteriana e o impedimento do mecanismo natural de descontaminação para pesticidas e outros xenobióticos. No entanto, existe uma lacuna acentuada na literatura, a respeito dos impactos ambientais e avaliação da toxicidade causada pela presença de antirretrovirais e seus produtos de degradação no ambiente.

Os fármacos, incluindo os antivirais, foram frequentemente detectados em efluentes e águas superficiais. Buchberger (2007) resumiu em seu artigo a análise avançada de resíduos de produtos farmacêuticos por cromatografia e eletroforese. Singer *et al.* (2008) descreveram o risco ambiental do oseltamavir. Ghosh *et al.*, 2010 mostraram a presença de metabólitos ativos de fosfato de oseltamivir em águas de um rio do Japão.

Um estudo conduzido por Prasse (2010) quantificou nove drogas antivirais em águas residuais marinhas com e sem tratamento (aciclovir, abacavir, lamivudina,

nevirapina, oseltamivir, penciclovir, ribavirina, estavudina, zidovudina). Todos os medicamentos antivirais, exceto ribavirina, foram detectadas em águas residuais sem tratamento, tendo sido observada uma redução significativa nas concentrações de aciclovir, lamivudina e abacavir em águas residuais tratadas, enquanto nevirapina, zidovudina e oseltamivir foram encontrados em concentrações semelhantes nas águas com e sem tratamento.

Estudo realizado por Wood *et al.* (2015), para detecção de antirretrovirais em águas superficiais mostrou que a Nevirapina foi detectada em todas as amostras. O fármaco é um inibidor da transcriptase reversa não nucleósido que é amplamente utilizado para o tratamento do HIV, bem como para a prevenção da transmissão vertical (COOVADIA *et al.*, 2012). A prevalência dessa substância pode estar atribuída não apenas seu uso terapêutico frequente, mas também a persistência do fármaco no ambiente. Vankova *et al.* (2010) demonstraram, em um sistema *in vitro*, que a Nevirapina é um fármaco pouco biodegradável (apenas 3%). O atazanavir e o efavirenz, não apresentam taxa de biodegradação rápida, de acordo com o modelo empregado pela estimativa de biodegradação BIOWIN v4.10.

Conforme Sanderson *et al.* (2004), medicamentos antivirais estavam entre os medicamentos terapêuticos mais perigosos no que diz respeito à sua toxicidade para algas e peixe. Assim, é necessário conhecer os caminhos da transformação de medicamentos antivirais no ambiente aquático.

De acordo com os resultados dos ensaios para avaliação do efeito agudo obtidos no presente trabalho, é improvável que estes ocorram no ambiente aquático, devido à diferença entre a CAE e a  $Cl_{50}$  (conforme a Tabela 8) uma vez que as concentrações ambientais previstas ( $\mu\text{g/L}$ ) dos três fármacos estudados (atazanavir, efavirenz e nevirapina) ocorrem em ordem de grandeza menor que as concentrações de efeito observadas ( $\text{mg/L}$ ). Apesar disso, não se pode descartar a hipótese da ocorrência de efeitos sinérgicos de misturas destes fármacos no ambiente, que possam potencializar o efeito destes, pois os ensaios foram realizados de forma isolada.

Tabela 8 - Comparativo dos valores de CAE e  $Cl_{50}$  (ensaio agudo) dos ARVs.

<b>Medicamento</b>	<b>CAE (mg/L)</b>	<b><math>Cl_{50}</math> (mg/L)</b>
Atazanavir	0,0063	73,04 (1,06 – 0,86)
Efavirenz	0,0039	11,46 (0,28 – 0,35)
Nevirapina	0,0010	84,61 (3,82 – 4,74)

Além disso, efeitos agudos podem ocorrer com a exposição dos organismos a concentrações mais elevadas do fármaco em caso de vazamento em plantas de produção ou acidentes com o transporte e, de forma indireta, já que o fármaco tem a capacidade de bioacumular e ser transferido pelos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

No presente estudo, a avaliação de efeito crônico dos fármacos atazanavir, efavirenz e nevirapina foi baseada na inibição do desenvolvimento embrionário com o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Estes organismos têm sido utilizados em ensaios de toxicidade crônica com base na verificação de que o desenvolvimento embrionário, por ser uma fase crítica para o crescimento normal da espécie, está relacionado ao seu sucesso reprodutivo. Foram observados valores de CEO, CENO e CI<sub>50</sub> respectivamente de 0,78 mg/L, 0,39 mg/L e 0,63 mg/L para o ATZ; 0,195 mg/L, 0,0975 mg/L e 0,52 mg/L para o EFV; e 0,39 mg/L, 0,195 mg/L e 0,97 mg/L para a NEV.

Apesar disso, as concentrações ambientais previstas destes fármacos em águas superficiais marinhas, estão abaixo das concentrações de efeito crônico para a espécie (conforme Tabela 9).

Tabela 9 - Comparativo dos valores de CAE e CI<sub>50</sub> (ensaio crônico) dos ARVs.

<b>Medicamento</b>	<b>CAE (mg/L)</b>	<b>CI<sub>50</sub> (mg/L)</b>
Atazanavir	0,0063	0,63 (0,62 – 0,64)
Efavirenz	0,0039	0,52 (0,50 – 0,53)
Nevirapina	0,0010	0,97 (0,95 – 0,98)

Com relação aos ensaios para avaliação dos efeitos crônicos, mesmo presentes em baixas concentrações, os fármacos apresentam capacidade de persistência no ambiente, o que aumenta a possibilidade de ocorrência de efeitos crônicos, uma vez que muitas espécies aquáticas são continuamente expostas a estes poluentes durante longos períodos de tempo ou durante todo o ciclo de vida (JONES *et al.*, 2007). Segundo Daouk *et al.* (2015) os antirretrovirais podem ser vistos como pseudo-poluentes persistentes no ambiente por causa de sua liberação contínua.

Algumas características físico-químicas dos medicamentos são importantes para avaliar sua ação no ecossistema como a sua lipossolubilidade, pois demonstra a sua capacidade de bioacumulação.

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, o efavirenz é um fármaco classe II, apresentando baixa solubilidade em água (cerca de 4 microgramas. mL<sup>-1</sup>), o que justifica o efeito mais significativo de CI<sub>50</sub> no *E. lucunter* para este fármaco quando em comparação ao atazanavir e a nevirapina (STORPITIS *et al.*, 2011)

Apesar de terem sido observados efeitos nos ensaios agudos e crônicos nos organismos testados, torna-se importante a continuidade de estudos de monitoramento de compostos emergentes nos ambientes aquáticos, seguidos de ensaios de quantificação e avaliação da toxicidade, com vistas na identificação dessas substâncias capazes de induzir efeitos na biota aquática.

De acordo com Robson *et al.* (2017), a exposição de peixes da espécie *O. mossambicus* por 96 horas a 20,6 ng.L<sup>-1</sup> de efavirenz provocou sérios danos ao fígado bem como um maior número de mortes de peixes em comparação ao controle. A nevirapina também teve efeitos ecotoxicológicos potenciais nas algas, dáfias e peixes, sendo as algas mais afetadas (NGUMBA *et al.*, 2016).

Os dados de toxicidade obtidos podem ser interpretados usando a diretiva 93/67/CEE (QUINN *et al.*, 2008), que classifica as substâncias de acordo com as concentrações de efeito estimadas (CEC, 1996). Considerando os dados obtidos com todas as substâncias analisadas, foi aplicada essa abordagem e o atazanavir, a nevirapina e o efavirenz, foram classificados como “Nocivos” quando contemplado os resultados dos ensaios de toxicidade aguda. Considerando os dados dos ensaios crônicos, as três substâncias foram classificadas como “Muito Tóxico” conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Classificação dos fármacos atazanavir, efavirenz e nevirapina baseado na diretiva 93/67/CEE da União Européia.

<b>Experimento agudo</b>		
<b>Medicamento</b>	<b>CI<sub>50</sub> mg/L</b>	<b>Classificação</b>
Atazanavir	73,04 (1,06 – 0,86)	Nocivo
Efavirenz	11,46 (0,28 – 0,35)	Nocivo
Nevirapina	84,61 (3,82 – 4,74)	Nocivo
<b>Experimento crônico</b>		
<b>Medicamento</b>	<b>CI<sub>50</sub> mg/L</b>	<b>Classificação</b>
Atazanavir	0,63 (0,62 – 0,64)	Muito tóxico
Efavirenz	0,52 (0,50 – 0,53)	Muito tóxico
Nevirapina	0,97 (0,95 – 0,98)	Muito tóxico

A comunidade científica reconhece os fármacos como compostos orgânicos bioativos que podem sofrer bioacumulação numa grande variedade de organismos. De fato, embora a maioria dos fármacos possa sofrer biotransformação, ainda podem ser excretados na forma ativa, podendo acumular-se em outros organismos ou no ambiente (MOMPELAT *et al.*, 2009; KNACKER *et al.*, 2010).

Dentre os fármacos encontrados no ambiente, podemos citar os ARVs. Embora sua concentração ambiental seja vestigial, sua liberação contínua pode impor riscos aos organismos presentes (SINGER *et al.*, 2008).

Com base no coeficiente de partição carbono orgânico no solo-água ( $K_{oc}$ ) estimado, espera-se que o atazanavir, efavirenz e nevirapina adsorvam em sólidos e sedimentos em suspensão (MEYLAN, 1992). Não é esperado que a volatilização das superfícies da água seja um processo de destino importante com base na constante estimada da Lei de Henry destas substâncias, porém pode haver um baixo potencial de bioconcentração em organismos aquáticos para o atazanavir, porém alto para o efavirenz (MEYLAN, 1999). Pode ocorrer hidrólise, no entanto, a taxa prevista indica que a reação seria muito lenta com meia-vida correspondente a 10.000 e 100.000 anos para pH 8 e 7, respectivamente.

Devido à importância da questão da geração de metabólitos de fármacos para uma avaliação ecotoxicológica mais próxima da realidade, foram reunidos na Tabela 11, dados referentes à metabolização dos antirretrovirais incluídos no presente estudo.

Tabela 11 - Metabolismo humano dos antirretrovirais.

<b>Antiretroviral</b>	<b>Metabólitos gerados</b>
Efavirenz	8-OH-efavirenz
Nevirapina	hidroxidrato de nevirapina
Atazanavir	sulfato de atazanavir

<sup>1</sup> Fonte: Pubchem e Drugbank

Faz-se necessária a realização da avaliação dos efeitos dos seus metabólitos, pois estes produtos podem sofrer fotodegradação quando em ambientes aquáticos. Isidori *et al.* (2005), demonstraram que os produtos de fototransformação do naproxeno eram consideravelmente mais tóxicos que o próprio medicamento.

Recomenda-se, ainda, avaliar a toxicidade dos excipientes, além dos produtos de metabolismo destes fármacos para maior elucidação dos efeitos ecotoxicológicos, pois eles podem ser possíveis causadores da toxicidade adicional apresentada nos resultados.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou os efeitos ecotoxicológicos de antirretrovirais após estimar a provável concentração destes fármacos em águas superficiais do município de Santos com a finalidade de avaliar os reflexos ambientais em ouriço-do-mar. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Foram calculadas as CAE dos 13 fármacos dispensados nos municípios de Santos e São Vicente, sendo que 12 destes precisam ser avaliados quanto ao destino e do efeito ambiental da substância, de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006).
- Foram selecionados após o cálculo da CAE os fármacos efavirenz, atazanavir e nevirapina, cujos valores estavam superiores a 0,01 µg/L
- A espécie estudada apresentou sensibilidade após exposição aos três fármacos estudados (Nevirapina, Atazanavir e Efavirenz), sendo os três fármacos considerados nocivos nos ensaios agudos e classificados muito tóxicos nos ensaios crônicos, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE.
- A espécie *Echinometra lucunter* demonstrou maior sensibilidade ao fármaco efavirenz quando em comparação aos demais fármacos estudados;

Os dados gerados a partir desta pesquisa poderão fornecer subsídios a adoção de programas governamentais regulares que visem o monitoramento dos níveis de fármacos em Estações de Tratamento de Efluentes, buscando soluções que propiciem a redução/eliminação da carga de produtos farmacêuticos para o meio ambiente.

## 7. TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

10/11/2020

Email – Luciana Guimaraes – Outlook

ESPR-D-20-13769 - ESPR: Submission Confirmation for Toxicity of antiretrovirals on the sea urchin *Echinometra lucunter* and its predicted environmental concentration in seawater from Santos Bay (Brazil) - [EMID:be4de27ee21dbc21]

em.espr.0.6f3aca.ce923555@editorialmanager.com <em.espr.0.6f3aca.ce923555@editorialmanager.com>

em nome de

Environmental Science and Pollution Research <em@editorialmanager.com>

Ter, 10/11/2020 15:56

Para: Luciana Guimaraes <lucianafarm@unisant.br>

Dear Dr. Guimarães,

Your submission entitled "Toxicity of antiretrovirals on the sea urchin *Echinometra lucunter* and its predicted environmental concentration in seawater from Santos Bay (Brazil)" has been received by Environmental Science and Pollution Research

The submission id is: ESPR-D-20-13769

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is

<https://www.editorialmanager.com/espr/>.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office

Environmental Science and Pollution Research

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; RACHID, B. R. F.; SOUZA, E.C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. A. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**. V. 50 pág. 875–885, 2005.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – **Ecotoxicologia Aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar** (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro. NBR 15350, 2012.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Aquatic Toxicology Test Methods**. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. Handbook of Ecotoxicology. Second Edition. Lewis Publisher. p. 19-43, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2003. **Resolução RDC nº 136**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm) Acesso em 16 jan.2019

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP, Rima, p. 117-152, 2006.

ARAUJO, K. S. de *et al.* Advanced oxidation processes: a review regarding the fundamentals and applications in wastewater treatment and industrial wastewater. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.387-401, 15 abr. 2016. Instituto de Pesquisas Ambientais em Bacias Hidrograficas (IPABHi). <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1862>.

ATRIBUNA. **Santos registra 5 casos de Aids por semana**. Disponível em: <<http://www.atribuna.com.br/noticias/noticias-detalle/cidades/santos-registra-5-casos-de-aids-por-semana/?cHash=6f14c8b0bb9cf56dc25e3370739ea3fb>> Acesso em 02 out.2016.

BARCELÓ, D. (editor). Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the watercycle. First edition. **Elsevier**. p. 387-417, 2007.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. **Série Manuais**. São Paulo: CETESB, 2009. 36p.

BERTOLETTI, E. ; BURATINI, S.A.; PRÓSPERI, V.A.; ARÚJO, R.P.A.; WERNER, L.I. Selection of relevant effects levels for using bioequivalence hypothesis testing. **Journal.Brazilian Society Ecotoxicology**., v.2, n.2, p.139-145, 2007.

BILA, D. M., DEZOTTI, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, 26(4), 523-530.

BRASIL. CONAMA. **Resolução 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 17 de março de 2005, edição n.53, seção 1, p.58-63. BRASIL.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal sobre aids, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/quais-sao-os-antirretrovirais>>. Acesso em 01 out.2016

BRASIL. Departamento de DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Indicadores e dados básicos do HIV/AIDS dos municípios brasileiros**. Disponível em: < <http://svs.aids.gov.br/aids/>> acesso em 01 outubro.2016b.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; JAWETZ, MELNICK e ADELBERG **Microbiologia Médica**, 21th ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

BUCHBERGER, W.W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. **Anal. Chemistry Acta** 593, 129–139.

CASARIN, F. Água: o ouro azul.: **Usos e abusos dos recursos hídricos**.. Rio de Janeiro: Garamond, 2011. 120 p.

CHMP. **Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use**. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. London, 1 June (2006). Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>> acesso em 02 out.2016

COOVADIA, H.M., BROWN, E.R., FOWLER, M.G., CHIPATO, T., MOODLEY, D., MANJI, K., MUSOKE, P., STRANIX-CHIBANDA, L., CHETTY, V., FAWZI, W., others, 2012. Efficacy and safety of an extended nevirapine regimen in infant children of breastfeeding mothers with HIV-1 infection for prevention of postnatal HIV-1 transmission (HPTN 046): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet** 379, 221e228.

ESCHER, BEATE *et al.* Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. **Water Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.75-92, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA). **Note for Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, CMPC/SWP/4447/draft**, disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500003978.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf) Acesso em 02 out.2016

FENT, K., WESTON, A.A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatica Toxicology**. 76: 122–159, 2006.

FERRARI, B., PAXEUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., GARRIC, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology Environmental**, Saf. 55 (3), 359–370.

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. p. 210, 1991.

GHOSH, G.C., NAKADA, N., YAMASHITA, N., TANAKA, H., 2010. Oseltamivir carboxylate, the active metabolite of oseltamivir phosphate (tamiflu), detected in sewage discharge and river water in Japan. **Environmental Health Perspective**. 118, 103–107.

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

HEBERER, T., 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal Hydrology**. 266 (3-4), 175–189.

JONES, O.A.H., VOULVOULIS, N., LESTER, J. N. Ecotoxicity of pharmaceuticals. In:

Petrovic, Barcelo D., Petrovic, M. (Eds.), **Comprehensive Analytical Chemistry** vol. 50. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 387-424, 2007.

JORGENSEN, S.E., HALLING-SORENSEN, B. **Drugs in the environment.** CHEMOSPHERE 40, 691-699, 2000.

KLAUS KÜMMERER. **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks.** Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, EUA. p 257-276, 1998.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A Ecotoxicologia Como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Ecologia Brasileira** 12 (3): p. 355-381, 2008.

MEYLAN, W. M. et al; **Environ Sci Technol** 26: 1560-67 (1992)

MEYLAN, W. M. et al; **Environ Toxicol Chem** 18: 664-72 (1999)

MOMPELAT, S., LE BOT, B. e THOMAS, O. (2009). Occurrence e fate of pharmaceutical products e by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, 35 (5), pp. 803-814

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

NGUMBA, E., GACHANJA, A., TUHKANEN, T., GACHANJA, A., 2016A. Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. **Sci. Total Environ.** 539, 1 –8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>

NIKOLAOU, A., MERIC, S. e FATTA, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water e wastewater environments. **Analytical e Bioanalytical Chemistry**, 387 (4), pp.1225-1234.

PRASSE C, SCHLÜSENER MP, SCHULZ R, TERNES TA. Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance? **Environmental Science Technology** 1;44(5):1728-35, 2010.

PEREIRA S.D.C, MARANHO. L.A, CORTEZ F.S, PUSCEDDU.F.H, SANTOS.R.A, RIBEIRO A.D, CESAR.A, GUIMARÃES L.L, 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone - **Science of the Total Environment** 548–549 (2016) 148–154

PSZCZOL, S. S. Echinodermata. In: Biodiversidade marinha da Baía da Ilha Grande. Org. Joel C. Creed; Débora O. Pires e Marcia A. de O. Figueiredo. **Ministério do Meio Ambiente**. Brasília, 416 p. 2007.

RAND G. (ed.) : Fundamentals of Aquatic Toxicology. **Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. Taylor and Francis Ltd., 1995, London

RANG H P, DALE M M, RITTER J M, FLOWER R J, HENDERSON G. RANG E DALE. **Farmacologia** 7ª ed. Rio de Janeiro : **Elsevier**, 2011. 768p.

ROBSON, L., BARNHOORN, I.E.J., WAGENAAR, G.M., 2017. The potential effects of efavirenz on *Oreochromis mossambicus* after acute exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56, 225 –232. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.017>

SANTOS, L. H.M.L.M., ARAÚJO, A.N., FACHINI, A., PENA, A., DELEURE-MATOS, C., MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceutical in the aquatic environment. *Journal of Harzardous Materials*, 175: 45-95, 2010.

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

RODRIGUEZ, I., QUINTANA, J.B., CARPINTEIRO, J., CARRO, A.M., LORENZO, R.A., CELA, R., 2003. Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal Chromatography*. A 985 (1–2), 265–274.

SINGER, A.C., HOWARD, B.M., JOHNSON, A.C., KNOWLES, C.J., JACKMAN, S., ACCINELLI, C., 2008. Meeting report: risk assessment of Tamiflu use under pandemic conditions. *Environmental Health Perspective* 16, 1563–1567.

STEIN, KAREN F.. **Silent Spring** (1962). Rachel Carson, [s.l.], p.61-106, 2012. SensePublishers. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-6209-068-2\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-6209-068-2_5)

STRAYER, DAVID L.; DUDGEON, DAVID. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal Of The North American Benthological Society*, [s.l.], v. 29, n. 1, p.344-358, mar. 2010. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1899/08-171.1>

STUMP, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; *Science of Total Environment*. 1999, 225, 135.

SUMPTER, J. P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, Weinheim*, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2005.

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

TOXNET (TOXICOLOGY DATA NETWORK). **DIDEOXYINOSINE (Didanosine)**. Disponível em <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~OJ5nRJ:1>>. Acesso em 01 out.2016.

UNAIDS. Data e Trends: **Global Statistics**. 2018. Disponível em: <<https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

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

Agency. p. 579, 1991.

VANKOVA, M., *et al.*, 2010. **Biodegradability Analysis of Pharmaceuticals Used in Developing Countries**; Screening with OxiTop C-110.

VENTURA, C. R. R.; VERÍSSIMO, I.; LIMA, R. N. P.; BARCELLOS, C. F.; OIGMAN-WOOD TP, BASSON AE, DUVENAGE C, ROHWER ER. The chlorination behaviour and environmental fate of the antiretroviral drug nevirapine in South African surface water. *Water Ressearch.*;104:349-360, 2016.

WOOD, TIMOTHY PAUL; DUVENAGE, CORNELIA S.J.; ROHWER, EGMONT. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 199, p.235-243, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>.

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