

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica

Cléssius Ribeiro de Souza

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ENTECAVIR EM *ALIIVIBRIO FISCHERI*,
MICROCYSTIS NOVACEKII, *ARTEMIA SALINA*, *BIOMPHALARIA GLABRATA* E
SEU TRATAMENTO POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO E
MICROBIOLÓGICO**

Belo Horizonte

2024

Cléssius Ribeiro de Souza

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ENTECAVIR EM *ALIIVIBRIO FISCHERI*,
MICROCYSTIS NOVACEKII, *ARTEMIA SALINA*, *BIOMPHALARIA GLABRATA* E
SEU TRATAMENTO POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO E
MICROBIOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Área de concentração: Medicamentos e Assistência Farmacêutica – Medicamentos em populações

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Micheline Rosa Silveira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Cíntia Aparecida de Jesus Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Paulo Gomes Mol

Belo Horizonte

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

S729a	<p>Souza, Cléssius Ribeiro de. Avaliação ecotoxicológica do entecavir em <i>Alivibrio fischeri</i>, <i>Microcystis novacekii</i>, <i>Artemia salina</i>, <i>Biomphalaria glabrata</i> e seu tratamento por processo oxidativo avançado e microbiológico [recurso eletrônico] / Cléssius Ribeiro de Souza. – 2024. 1 recurso eletrônico (169 f. : il.) : pdf</p> <p>Orientadora: Micheline Rosa Silveira. Coorientadores: Cíntia Aparecida de Jesus Pereira. Marcos Paulo Gomes Mol.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.</p> <p>Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Toxicologia – Teses. 2. Artemia – Teses. 3. Fármacos – Teses. 4. Meio ambiente – Teses. 5. Biodegradação – Teses. I. Silveira, Micheline Rosa. II. Pereira, Cíntia Aparecida de Jesus. III. Mol, Marcos Paulo Gomes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 615.19</p>
-------	---

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ENTECAVIR EM ALIIVIBRIO FISCHERI, MICROCYSTIS NOVACEKII, ARTEMIA SALINA, BIOMPHALARIA GLABRATA E SEU TRATAMENTO POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO OU MICROBIOLÓGICO

CLÉSSIUS RIBEIRO DE SOUZA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, área de concentração MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA.

Aprovada em 19 de novembro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Micheline Rosa Silveira - Orientadora (FAFAR-UFMG)
Cintia Aparecida de Jesus Pereira - Coorientadora (UFMG)
Marcos Paulo Gomes Mol - Coorientador(FUNED)
Raquel Sampaio Jacob (PUCMG)
Gilcinea de Cassia Santana (UFMG)
Antônio Sousa Santos (UFVJM)
Jorgino Julio Cesar (Centro Universitário UNA)



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Paulo Gomes Mol, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Micheline Rosa Silveira, Vice diretor(a) de unidade**, em 21/11/2024, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Sousa Santos, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorgino Julio Cesar, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Sampaio Jacob, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 22:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gilcinea de Cassia Santana, Chefe de departamento**, em 22/11/2024, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Aparecida de Jesus Pereira, Professora do Magistério Superior**, em 02/12/2024, às 22:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3747408** e o código CRC **FE47EE0D**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GÉRIAS

Reitora

Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Isabela Almeida Pordeus

Pró-Reitor de Pesquisa

Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE FARMÁCIA

Diretora

Prof.^a. Leiliane Coelho André

Vice-Diretora

Prof.^a. Micheline Rosa Silveira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA

Coordenadora

Prof. Clarice Chemello

Subcoordenadora

Prof.^a. Cristiane A. M. de Pádua

Colegiado

Titulares

Prof. Adriano Max Moreira Reis

Prof. Mariana Martins G. do Nascimento

Prof. Augusto Afonso G. Junior

Prof. Clarice Chemello

Ana Rafaela Pires Lira

Suplentes

Prof.^a. Cristiane A. M. de Pádua

Prof.^a. Maria Auxiliadora Martins

Prof. Juliana Alvares Teodoro

Prof.^a. Simone de A. M. M.

Discente Isabela Lima de Oliveira

Dedico esse trabalho a todos que, por meio da pesquisa, extensão ou da simples prática, compreendem que todos fazemos partes da terra mãe e por isso agem de forma a restaurar o equilíbrio ambiental existente desde a criação.

Uma especial dedicatória a minha mãe e familiares que sempre compreenderam minha missão enquanto estudante e cidadão.

AGRADECIMENTOS

Reconhecer que somos pequenos, compreender que não somos donos da natureza e agir como parte integrante dela é um bom começo para agradecer por ainda podermos respirar, admirar e contemplar tudo a nossa volta. O dom da vida é um ato contínuo de agradecimento!

Obrigado a minha queridíssima mãe, Nadir Ribeiro de Souza, que nunca deixou de apoiar os estudos de seus filhos, desde a pré-escola até o tão sonhado doutoramento.

Obrigado aos meus irmãos Cléverson e Carolina, que me ajudaram com acolhimento e diversão necessária para equilibrar o trabalho de pesquisa.

Obrigado ao Everton e Andreia que também me apoiaram em minha jornada com carinho e boas conversas.

Aos meus queridíssimos sobrinhos, Luiz, Miguel, Gabriel e Maria, que enchem meu coração de alegria com o carinho e entusiasmos que somente as crianças sabem proporcionar.

Obrigado aos colegas de trabalho da FUNED e do DESA, Olívia Vasconcelos, Paula Von, Paula Ortolani, Carolina Moreira, Maria Clara Starling e, Fernando Rodrigues fundamentais para que o projeto acontecesse.

Obrigado muito especial ao Gabriel Silva, pessoa chave nos projetos de ecotoxicologia do Laboratório de águas da FAFAR. Sua contribuição superou as expectativas e, por isso, merece toda minha gratidão pelo seu esforço em me ajudar e amizade.

Agradeço ainda aos orientadores Cíntia Aparecida e Marcos Mol que abraçaram o projeto, que corrigiram o direcionamento dos estudos, que me deram a mão nos momentos de dúvidas e que acreditaram que seria possível.

A minha querida orientadora Micheline Silveira que ultrapassou o limite de orientadora e alcançou os patamares de amizade, companheirismo e de ideais. Sem sua atuação em prol da ciência, da educação da pesquisa e desenvolvimento, não seria possível a realização desse projeto. Serei eternamente grato por tudo!

E, se tudo isso foi possível, foi que há graça de Deus, porque, tementes ou não, Ele nos quer bem. Nós é que tendemos a nos afastar. Obrigado por me conceder a oportunidade de contribuir para a vida das pessoas e para o meio ambiente.

“O ambiente humano e o ambiente natural degradam-se em conjunto; e não podemos enfrentar adequadamente a degradação ambiental, se não prestarmos atenção às causas que têm a ver com a degradação humana e social”

(Papa Francisco, *Laudato Si* – Sobre o cuidado da casa comum, 2015).

RESUMO

A presença de fármacos lançados rotineiramente no meio ambiente, provenientes de atividades produtivas, de serviços ou mesmo do uso terapêutico, é um potencial poluente de ecossistemas, em especial os aquáticos. O impacto dos medicamentos no meio ambiente, além da possibilidade de desfechos de alterações de comportamento ou morte, pode levar a alterações gênicas, enzimáticas ou ambas simultaneamente. O entecavir (ETV) é um antiviral utilizado para o tratamento da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Cerca de 68 a 73% do fármaco é eliminado na forma inalterada pelos rins. Os possíveis impactos ambientais do ETV foram avaliados por meio de estudos ecotoxicológicos utilizando *Aliivibrio fischeri*, *Microcystis novacekii*, *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* como modelos biológicos. Além disso, possíveis propostas de remoção em fase aquosa foram propostas por meio da reação de Fenton-like e da biodegradação utilizando a *M. novacekii*. Revisões da literatura referente as estimativas de fármacos no meio ambiente, com foco nos antirretrovirais e nas alterações genotóxicas em *A. salina* na presença de diversos poluente também foi elaborada conforme as diretrizes PRISMA. Foi estimado que, aproximadamente 112 toneladas de antirretrovirais (ARV) são lançados no meio ambiente por meio da excreção humana, além dos descartes inadequados e falhas nos tratamentos de efluentes farmacêuticos. Para os estudos ecotoxicológicos com ETV, os modelos biológicos foram expostos a um gradiente de concentração do fármaco, por períodos definidos, e avaliado como desfecho a bioluminescência (*A. fischeri*), crescimento celular (*M. novacekii*), imobilidade (*A. salina*), comportamento e morte (*B. glabrata*). Os resultados ecotoxicológicos do ETV não apresentaram toxicidade aguda em concentrações inferiores a 100 mg/L nos modelos aquáticos estudados. No entanto, a não confirmação de toxicidade aguda nos modelos biológicos expostos ao ETV não pode ser vista como ausência de toxicidade desse fármaco, devendo estudos de toxicidade crônica serem realizados de forma a complementar os resultados. A aplicação da reação de Fenton-like para remoção do ETV mostrou-se eficaz e promissora. Após 90 segundos de reação a concentração de 300 mg/L alcançou nível indetectável. No entanto, a biodegradação por meio da *M. novacekii* apresentou baixa taxa de remoção do ETV (máximo de 28,9%) para sua utilização direta na remediação de ambientes aquáticos. O compilado de todos esses estudos demonstra as pressões sobre o meio ambiente proveniente dos fármacos antivirais. Mesmo não sendo verificada toxicidade aguda para alguns modelos biológicos, como no caso do ETV, existe um potencial para o desenvolvimento de mecanismos de resistência em vírus, bactérias

e até em outros organismos superiores. Nesses casos, a *Artemia* se mostrou um modelo promissor para avaliar a ecotoxicidade de diferentes tipos de substâncias químicas por meio de testes de genotoxicidade. A possibilidade de monitorar organismos de níveis tróficos inferiores por meio de metabólitos e atividades enzimáticas pode ampliar a avaliação de impactos ambientais, principalmente em ecossistemas costeiros.

Palavras-chave: entecavir; ecotoxicologia; fenton; biodegradação; genotoxicidade; artemia; fármaco; meio ambiente.

ABSTRACT

The presence of drugs routinely released into the environment, from production activities, services or even therapeutic use, is a potential pollutant of ecosystems, especially aquatic ones. The impact of drugs on the environment, in addition to the possibility of behavioral changes or death, can lead to gene or enzyme alterations, or both at the same time. Entecavir (ETV) is an antiviral used to treat hepatitis B virus (HBV) infection and is available from the Unified Health System (SUS). Around 68 to 73% of the drug is eliminated in unchanged form by the kidneys. The possible environmental impacts of ETV were assessed through ecotoxicological studies using *Aliivibrio fischeri*, *Microcystis novacekii*, *Artemia salina* and *Biomphalaria glabrata* as biological models. In addition, possible proposals for aqueous phase removal were proposed by means of the Fenton-like reaction and biodegradation using *M. novacekii*. A review of the literature regarding estimates of pharmaceuticals in the environment, with a focus on antiretrovirals and genotoxic alterations in *A. salina* in the presence of various pollutants, was also carried out in accordance with the PRISMA guidelines. It has been estimated that approximately 112 tons of antiretrovirals (ARVs) are released into the environment through human excretion, as well as inadequate disposal and failures in pharmaceutical effluent treatment. For the ecotoxicological studies with ETV, the biological models were exposed to a concentration gradient of the drug, for defined periods, and bioluminescence (*A. fischeri*), cell growth (*M. novacekii*), immobility (*A. salina*), behavior and death (*B. glabrata*) were evaluated as outcomes. The ecotoxicological results of ETV showed no acute toxicity at concentrations below 100 mg/L in the aquatic models studied. However, the failure to confirm acute toxicity in the biological models exposed to ETV cannot be seen as an absence of toxicity of this drug, and chronic toxicity studies should be carried out to complement the results. The application of the Fenton-like reaction to remove ETV proved to be effective and promising. After 90 seconds of reaction, the concentration of 300 mg/L reached an undetectable level. However, biodegradation by *M. novacekii* showed a low rate of ETV removal (maximum 28.9%) for direct use in the remediation of aquatic environments. The compilation of all these studies shows the pressures on the environment from antiviral drugs. Even though acute toxicity has not been verified for some biological models, as in the case of ETV, there is a potential for the development of resistance mechanisms in viruses, bacteria and even other higher organisms. In these cases, *Artemia* has proved to be a promising model for assessing the ecotoxicity of different types of chemical substances through genotoxicity tests. The possibility of monitoring

organisms at lower trophic levels through metabolites and enzymatic activities can broaden the assessment of environmental impacts, especially in coastal ecosystems.

Keywords: entecavir; ecotoxicology; fenton; biodegradation; genotoxicity; artemia; drug; environment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Possíveis rotas de medicamentos e outros poluentes emergentes para o meio ambiente	22
Figura 2 – Quadro situacional do esgotamento sanitário do Brasil em 2022.....	24
Figura 3 - A. Arquitetura de domínio da polimerase do vírus da hepatite B destacando várias áreas e períodos responsáveis pelo funcionamento adequado da polimerase. B. Ciclo de vida do HBV desde a entrada nos hepatócitos até a geração de partículas de vírions e amplificação de DNA circular fechado covalentemente.	26
Figura 4 - Níveis de organização biológica e respostas aos efeitos de poluentes/contaminantes	29
Figura 5 – Esquema de realização do teste de toxicidade aguda baseado em modelo biológico de microcrustáceo.....	30
Figura 6 – Fotografia de <i>Aliivibrio fischeri</i>	35
Figura 7 – Fotografia de colônias de <i>Microcystis novacekii</i>	37
Figura 8 - Esquema do processo mixotrófico para utilização de poluentes em águas residuais [Orgânicos (CHO), N e P] com a luz como fonte de energia em fotoautotrofia e/ou de orgânicos com $[\Delta H]$ em heterotrofia.....	38
Figura 9 - Fotografia de <i>Artemia salina</i> adulta	40
Figura 10 – Morfologia do <i>Biomphalaria glabrata</i>	42
Figura 11 – Fotografia de um exemplar de <i>Biomphalaria glabrata</i>	43
Figura 12 - Metabolismo de xenobióticos em organismos fotossintéticos. As reações de passagem são representadas por linhas pontilhadas.	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação e propriedades físico-químicas do entecavir	27
Quadro 2 - Testes de Ecotoxicologia aquática padronizados no Brasil	32
Quadro 3 - Sistemas típicos de processos oxidativos avançados	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantitativo de pessoas em tratamento da hepatite B e unidades farmacotécnicas de entecavir distribuídas no Brasil pelo Sistema Único de Saúde entre 2019 a 2021.....	28
Tabela 2 - Potencial de oxidação de substâncias/espécies oxidantes.	45

SUMÁRIO

1	ESTRUTURA DA TESE	18
2	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	19
2.1	Fármacos no meio ambiente	22
2.2	Hepatite e o entecavir.....	24
2.3	Ecotoxicologia de fármacos	28
2.3.1	Modelos ecotoxicológicos.....	34
2.3.1.1	<i>Aliivibrio fischeri</i>	34
2.3.1.2	<i>Microcystis novacekii</i>	36
2.3.1.3	<i>Artemia salina</i>	39
2.3.1.4	<i>Biomphalaria glabrata</i>	41
2.3.1.5	Estudos de toxicidade com <i>Biomphalaria glabrata</i>	43
2.4	Remoção de fármacos por processo oxidativo avançado e por ação de cianobactérias ...	44
2.4.1	Processos Oxidativos Avançados no tratamento de efluentes	44
2.4.2	Remoção biológica no tratamento de efluentes	48
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivos específicos	52
4	REFERÊNCIAS	53
5	CAPÍTULO 1 – ESTIMATIVA DE ELIMINAÇÃO NO MEIO AMBIENTE E REVISÃO DE LITERATURA DE ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS PRINCIPAIS ANTIRRETROVIRAIS MAIS UTILIZADOS NO BRASIL	63
8	CAPÍTULO 2 – ECOTOXICIDADE DO ENTECAVIR SOBRE OS ORGANISMOS <i>ALIIVIBRIO FISCHERI</i>, <i>MICROCYSTIS NOVACEKII</i>, <i>ARTEMIA SALINA</i> E <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i>	86
9	CAPÍTULO 3 – REMOÇÃO DO ENTECAVIR POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO E POR AÇÃO DE CIANOBACTERIA	107
10	CAPÍTULO 4 – ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE GETOXICIDADE DIRETA E INDIRETA COM <i>ARTEMIA</i>: UMA REVISÃO INTEGRATIVA	126
11	CONCLUSÃO GERAL	168
	ANEXOS	169

1 ESTRUTURA DA TESE

A tese foi estruturada com uma introdução composta pelas considerações iniciais, para a compreensão do trabalho, os respectivos objetivos e quatro capítulos na forma de artigos científicos.

O capítulo 1 apresenta o artigo “Estimativa de eliminação no meio ambiente e revisão de literatura de aspectos ecotoxicológicos dos principais antirretrovirais mais utilizados no Brasil”. O estudo teve como objetivo estimar o consumo e a quantidade de antirretrovirais (ARV) eliminados inalterados no meio ambiente e realização de uma pesquisa bibliográfica sobre estudos de ecotoxicologia aquática de ARV utilizados no Brasil. Esse estudo foi publicado na revista *Research, Society and Development*, <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32975>.

O capítulo 2 apresenta o artigo referente à ecotoxicologia do entecavir em diferentes modelos biológicos, contemplando na cadeia trófica produtores, consumidores primários e consumidores secundários, o qual foi submetido a revista *ACS Chemical Health & Safety* em 14 de novembro de 2024 e está em processo de revisão.

O capítulo 3 apresenta o artigo referente a remoção do entecavir pelo processo de Fenton-like e por ação da cianobactéria *Microscistys novacekii*. O artigo foi submetido à revista *Toxics* em 7 de novembro de 2024 e está em processo de revisão.

Por fim, o capítulo 4 apresenta a visão ampla e atualizada das nuances da genotoxicidade utilizando o gênero *Artemia* como modelo biológico apresentado no artigo “Estudos ecotoxicológicos de genotoxicidade direta e indireta com *Artemia*: uma revisão integrativa”, o qual foi publicado no *Journal of Environmental Science and Health, part A*, <https://doi.org/10.1080/10934529.2024.2384216>.

2 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O avanço tecnológico e científico no campo da saúde trouxe inúmeros benefícios para humanidade, com conseqüente melhoria na qualidade e expectativa de vida das pessoas. Contudo, novos problemas decorrentes do extenso uso de medicamentos surgem com desafios a serem solucionados. A presença de fármacos lançados rotineiramente no meio ambiente, provenientes de atividades produtivas, de serviços ou mesmo do uso terapêutico, é um potencial poluente de ecossistemas, em especial os aquáticos (ESCHER et al., 2019; WILKINSON et al., 2022). O resíduo gerado pela produção e utilização de medicamentos, especialmente antibióticos, antivirais e antirretrovirais (ARV) pode estar associado a processos de geração de cepas bacterianas e virais resistentes, podendo ainda desequilibrar os ecossistemas, impactando o meio ambiente e a saúde pública (BILA; DEZOTTI, 2003; KUMAR et al., 2021; LAURETI; MATIC; GUTIERREZ, 2013; NANNOU et al., 2020).

Os diversos caminhos pelos quais os fármacos podem chegar aos corpos d'água incluem os resíduos gerados pela indústria farmacêutica, quando mal gerenciados, pelo descarte incorreto da população (no esgoto ou nos resíduos comuns), pelo consumo e excreção das parcelas não absorvidas e metabolizadas pelo organismo (humano ou animal) e pelo descarte incorreto por alguns dos atores da logística de distribuição (KAR et al., 2020). Adicionalmente a essas possibilidades, os sistemas convencionais de tratamento de esgotos e água nem sempre estão preparados tecnologicamente para eliminação desse tipo de contaminante (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

No Brasil, além das estações de tratamento de esgoto não removerem fármacos, ainda há a baixa cobertura de tratamento do esgoto sanitário, em torno de 52,2%, variando de 19,8% na região Norte a 61,6% na região sudeste, segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – SNIS (BRASIL, 2023a), o que aumenta substancialmente a sobrecarga de poluentes nos corpos d'água. Adicionalmente, persiste a carência na legislação brasileira para monitoramento de estudos ecotoxicológicos para os fármacos, complexidade do processamento e o alto custo para o monitoramento de fármacos em efluentes líquidos. (CONAMA, 2005, 2011a). Assim, novas metodologias de degradação necessitam de avaliação técnica e verificação de eficácia, com o intuito da proposição de melhorias nas plantas de tratamento de efluentes líquidos (CAO et al., 2022; GRABARCZYK et al., 2020).

O processo oxidativo avançado, por meio da reação de Fenton, é promissor para a degradação de substâncias orgânicas, incluindo os fármacos (MARCELINO et al., 2013). Outra

proposta de mitigação dos poluentes é a utilização de organismos capazes de utilizá-los como substrato, degradando-os em substâncias menos tóxicas ou removendo-os da fase aquosa por meio de processos naturais associados à adsorção, por exemplo. Dentre esses organismos destaca-se as cianobactérias, como a *Microcystis novacekii*, amplamente distribuída no Brasil, que possui baixa necessidade de nutrientes para sobrevivência e pode utilizar as mais diversas substâncias disponíveis no meio líquido como nutrientes (FERREIRA, 2013; FIORANTE, 2013).

Nesse contexto, os fármacos de diversas classes terapêuticas podem desencadear efeitos ambientais negativos. Dentre os diversos fármacos, o antiviral entecavir (ETV), se destaca pela falta de estudos ecotoxicológicos e por ter a possibilidade de agir sobre vírus que tem a capacidade de mutação acentuada. Esse fármaco é utilizado para o tratamento da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Foi aprovado pelo *Food Drugs and Administration* (FDA) em março/2005, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em julho/2005 e *European Medicines Agency* (EMA) em agosto/2006, sendo atualmente um dos medicamentos de primeira linha para o tratamento dos casos crônicos da hepatite B (ANVISA, 2006; EMA, 2006; FDA, 2011; WHO, 2015). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima transcriptase reversa por meio da integração ao DNA viral com consequente inibição da enzima DNA polimerase dependente de RNA viral (RIVKIN, 2005). Como todo antimicrobiano, a exposição a sub-doses ou a interrupção da terapia medicamentosa pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos (VILLET et al., 2007).

Para avaliação e monitoramento das alterações que os poluentes provocam nos organismos e no meio ambiente, foram desenvolvidos métodos ecotoxicológicos, permitindo sugerir os potenciais efeitos ambientais negativos nos organismos e ecossistemas (BELDEN, 2020; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015). Para tanto, além de modelos ecotoxicológicos de diferentes níveis tróficos já estabelecidos pelas diversas agências reguladoras e outras organizações, como o *Aliivibrio fischeri*, a *Daphnia magna* e o *Danio rerio*, busca-se o desenvolvimento de novos modelos, sobretudo com organismos autóctones das regiões impactadas. Além disso, os xenobióticos podem promover diferentes alterações gênicas alterando a fisiologia celular, enzimática, individualmente ou simultaneamente, levando inclusive a mutagenicidade (JHA, 2008).

Dentre os modelos ecotoxicológicos, o *Biomphalaria glabrata*, um caramujo de água doce, está sendo utilizado como modelo biológico para avaliação de poluentes por vários

pesquisadores (ALLAN; BLOUIN, 2017; AM et al., 2018; LIMA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2021; SULLIVAN; CASTRO, 2005; TALLARICO et al., 2004; VS et al., 2008). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) publicou, até o momento, 26 normas referentes ao assunto, porém, não há nenhuma norma que utiliza molusco da espécie *Biomphalaria glabrata* como modelo ecotoxicológico. Esse molusco, da família *Planorbidae*, é o hospedeiro intermediário do *Shistosoma mansoni*, com ampla ocorrência nos estados brasileiros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul, Centro Oeste e norte (BRASIL, 2018; DUTRA; SCHOLTE, 2008). Considerando os requisitos apresentados por Belden (2020) para utilização de espécies nos estudos ecotoxicológicos, esse molusco apresenta-se como uma espécie alternativa potencialmente susceptível à padronização por ser biologicamente e fisiologicamente bem conhecida, estar disponível, praticamente, em todas as estações do ano, ser de fácil tratamento e manuseio laboratorial, apresentar sensibilidade a contaminantes e não estar na lista de espécies protegidas, as quais requerem autorizações especiais dos órgãos governamentais. Outra possibilidade é o desenvolvimento de estudos de ecotoxicidade no nível celular, como demonstrado por Souza-Silva *et al.* (2023) nas respostas dos hemócitos expostos ao tenofovir.

Além do molusco, *Microcystis sp* são cianobactérias com ampla distribuição no Brasil que, na presença de excesso de material orgânico, reproduzem aceleradamente, degradando os materiais com a liberação de toxinas extremamente nocivas a fauna e flora (FREITAS et al., 2012). No nível trófico intermediário, *Artemia salina*, *Daphnia magna* e *smilis* são os microcrustáceos, respectivamente, de água salgada e doce mais utilizados para avaliação de ecotoxicidade de substâncias. No nível trófico mais baixo, a bactéria *Aliivibrio fischeri* é amplamente utilizada em análises ecotoxicológicas uma vez que possui padronização da técnica, custo baixo e de rápida execução na avaliação da toxicidade aguda de substâncias (ABBAS et al., 2018; GATIDOU; STASINAKIS; IATROU, 2015; VENTURA et al., 2014; VERMA; MIYASHIRO, 2013).

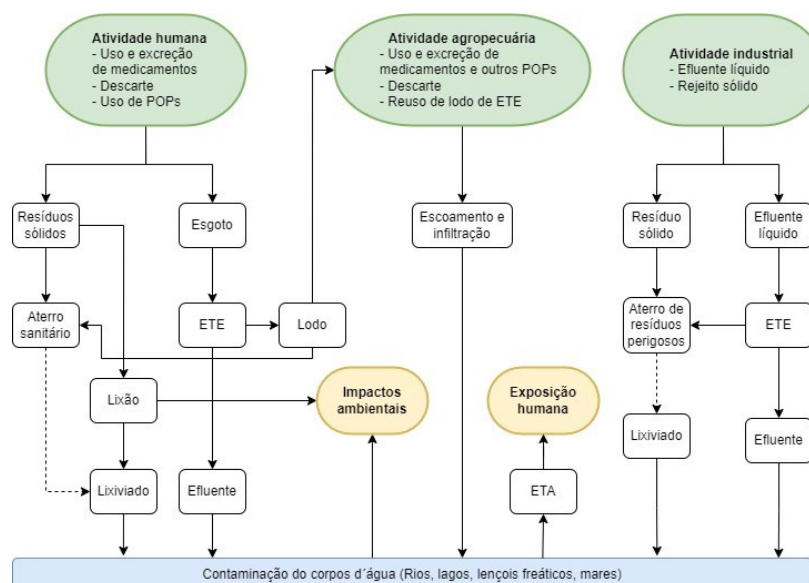
Todo esse arcabouço envolvendo o medicamento ETV, seus impactos sociais e ambientais compreendem a linha de pesquisa “Medicamentos em Populações” do Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica (PPGMAF) da Faculdade de Farmácia da UFMG. Ela abrange aspectos epidemiológicos, médicos, econômicos, ambientais e socioculturais, que busca gerar conhecimento para mitigar as consequências socioambientais do descarte de medicamentos.

2.1 Fármacos no meio ambiente

Com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico, houve um aumento exponencial no número de novos fármacos e nas quantidades produzidas em todo o mundo (AKKARI et al., 2016; KORNIS; BRAGA; DE PAULA, 2014). Os benefícios do desenvolvimento dos medicamentos, produtos para a saúde, detergentes, desinfetantes, surfactantes, pesticidas e outros compostos orgânicos são evidenciados pela melhoria da qualidade de vida dos seres humanos, animais domésticos e animais destinados à atividade agrícola, no entanto, o ciclo de produção e consumo geram novos tipos de resíduos considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) (TANG et al., 2019). Os POPs são compostos orgânicos resistentes à degradação ambiental por meio de processos biológicos, químicos e fotolíticos gerando toxicidade (RASHED, 2022). Como exemplo, os resíduos de processos produtivos da indústria química e farmacêutica, medicamentos descartados de forma inadequada e os seus metabólitos associados ao consumo (JAIN et al., 2013; NCUBE et al., 2018; RASHED, 2022). Devido à sua persistência, os POPs podem se bioacumular ou biomagnificar e afetar negativamente a saúde humana e o meio ambiente (RASHED, 2022).

Mesmo nos processos de descarte de fármacos, com processos técnicos e ecologicamente corretos, esses insumos podem expostos ao ser humano, por meio da cadeia alimentar e até mesmo pelo consumo de água potável, conforme demonstrado na figura 1 (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Figura 1 - Possíveis rotas de medicamentos e outros poluentes emergentes para o meio ambiente



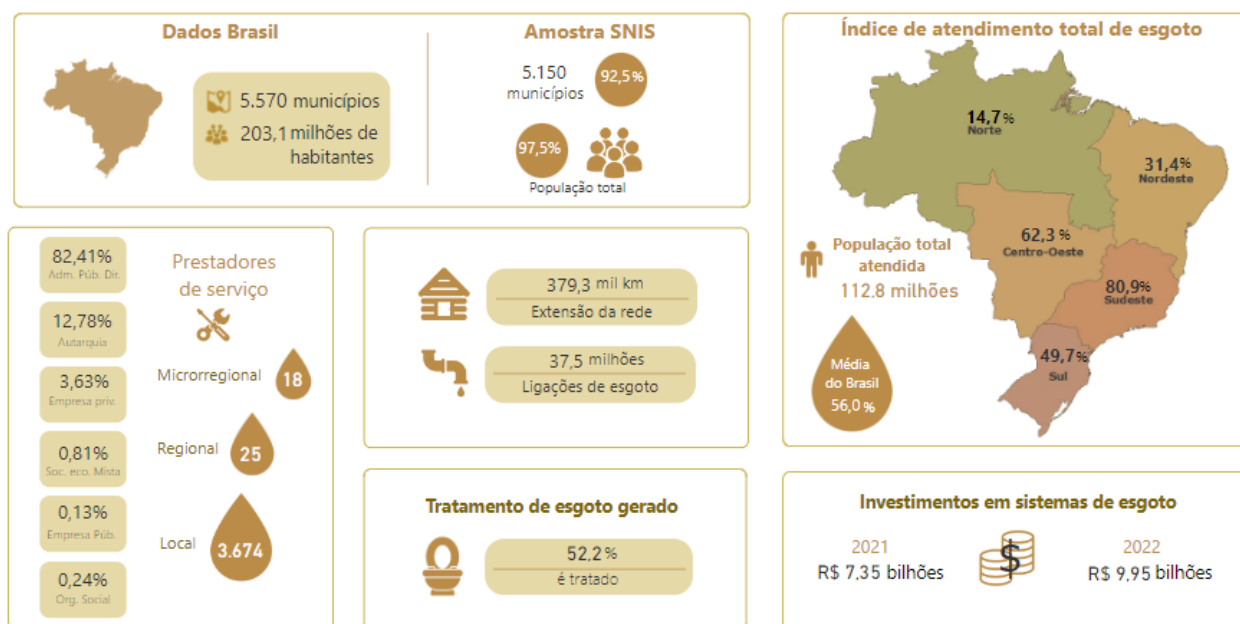
POPs: Poluentes Orgânicos Persistentes; ETE: Estação de tratamento de efluente; ETA: Estação de tratamento de água; Seta tracejada: Falha na contenção

Fonte: (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013)

Segundo KAR, et al. (2020), foi evidenciada a presença de mais de 600 fármacos e produtos para cuidado e higiene pessoal (cosméticos) em superfícies aquáticas, subterrâneas e no esgoto em 71 países. Antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, antineoplásicos, ansiolíticos, antidepressivos, barbitúricos, anticonvulsivantes e hormônios foram as classes de medicamentos mais relatados nas pesquisas. Em um estudo recente de prospecção de fármacos em rios de todo o mundo, quatro foram encontrados em todos os continentes, incluindo a Antártida, cafeína, nicotina, acetaminofeno e conitina. Quando se exclui a Antártida, 14 fármacos foram encontrados no rios, atenolol, carbamazepina, cetirizina, citalopram, desvenlafaxina, fexofenadina, gabapentina, lidocaína, metformina, naproxeno, sitagliptina, temazepam, trimetropim, venlafaxina (WILKINSON et al., 2022). Embora em concentrações na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, são substâncias biologicamente ativas que podem desencadear efeitos farmacodinâmicos em organismos aquáticos, comprometendo a qualidade dos recursos hídricos, alterando a biodiversidade, o equilíbrio dos ecossistemas e impactando na saúde humana (ESCHER et al., 2019; MELO et al., 2009). Vale ressaltar que, mesmo quando tratados, os efluentes e lixiviados, podem apresentar subprodutos de degradação dos fármacos que são potencialmente ativos ou tóxicos aos organismos aquáticos (BILA; DEZOTTI, 2003).

Por meio do tratamento efetivo dos resíduos e efluentes e o correto manejo de destinação final é possível reduzir o impacto desses poluentes no meio ambiente. No Brasil, na Resolução 430 do Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA), de 13 de maio de 2011, há a exigência do tratamento prévio dos resíduos a serem descartados pelas indústrias e hospitais (CONAMA, 2011). No que se refere ao esgoto doméstico, embora o saneamento básico universal esteja previsto na Constituição e garantido pela Lei 11.445/2001, na prática é possível observar a ausência da coleta e tratamento de esgoto universal. Conforme informações da Agência Nacional de Águas (ANA), apresentada na figura 2, apenas 56% da população brasileira tem acesso a coleta adequada de esgoto e 52,2% do esgoto produzido tem o tratamento adequado (BRASIL, 2023a).

Figura 2 – Quadro situacional do esgotamento sanitário do Brasil em 2022



Fonte: BRASIL (2023a)

Ainda que existam metodologias para mitigar a carga de resíduos lançados no ambiente, é necessária uma avaliação quanto a sua eficiência e possíveis efeitos dos fármacos sobre a vida aquática (CONAMA, 2011; Gazola, 2020). No Brasil, a maior parte dos processos de tratamento de efluentes, esgotos e lixiviados utiliza reatores anaeróbios de fluxo ascendente (RAFA). Também são utilizados processo de tratamento por lagoas aeradas. Além disso, na Resolução nº 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) está determinado que o tratamento de esgoto domésticos reduza, no mínimo, em 60,0% a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) na decomposição de matérias orgânicas, evidenciando que no mínimo, 40% de matéria orgânica, no qual se inclui os fármacos, podem ser lançados no corpos hídricos pós tratamento do esgoto (CONAMA, 2011). As legislações vigentes são de abrangência geral, não possuem especificidade para remoção de fármacos, medicamentos e outras substâncias recalcitrantes.

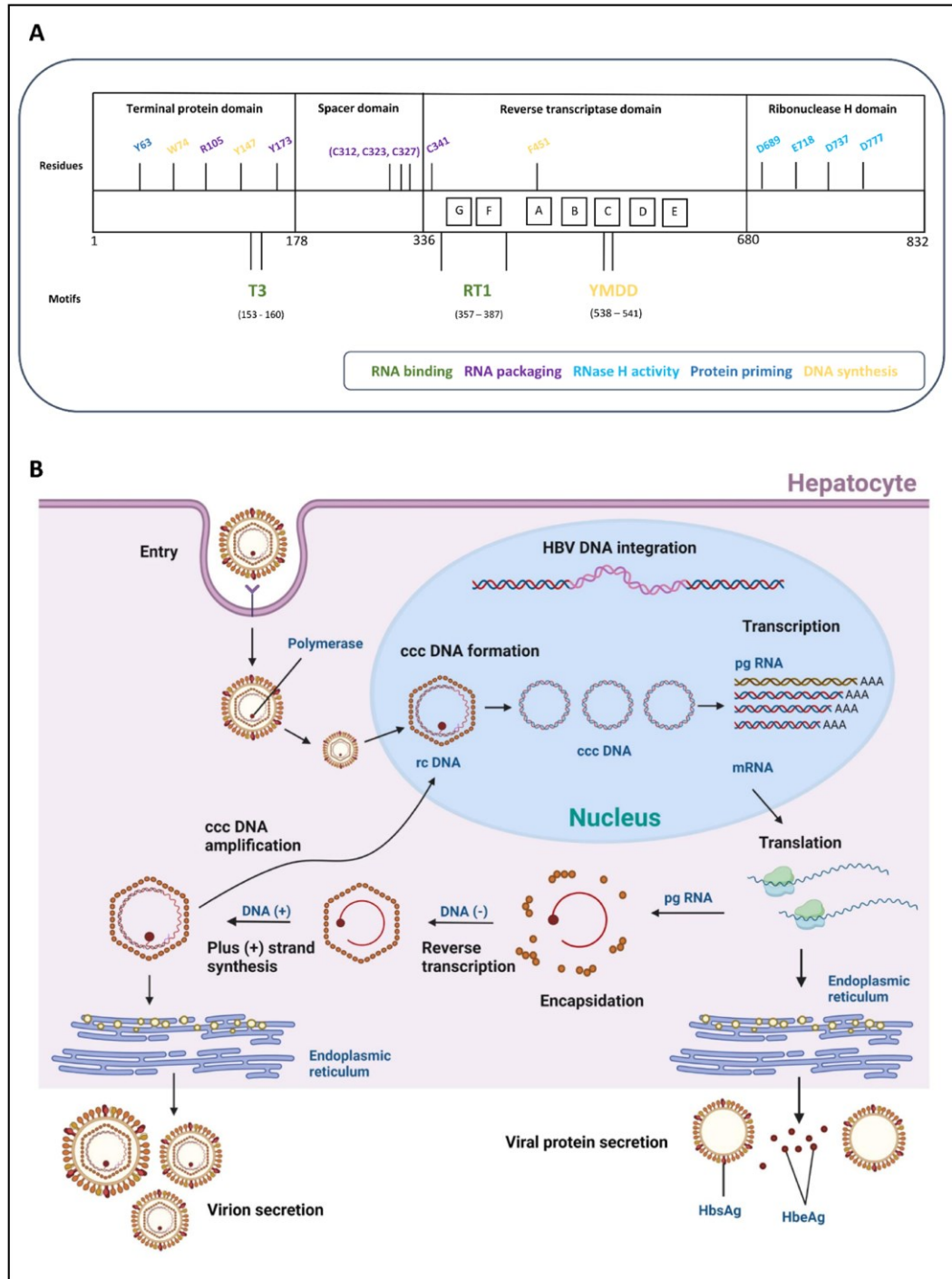
2.2 Hepatite e o entecavir

A hepatite viral B é uma doença hepática causada pelo vírus da hepatite B (VHB) o qual pertencente à família *Hepadnaviridae*, são vírus pequenos envelopados, com DNA de fita dupla incompleta que se replicam por meio da enzima transcriptase reversa, que está localizada em

um dos domínios da enzima DNA-polimerase viral, para produção do DNA viral (RANGA et al., 2023).

Seu ciclo de vida nas células hepáticas está bem documentado na literatura científica. Resumidamente, o processo e replicação está exemplificado na figura 3. Ao acessar os hepatócitos, o HBV entra no núcleo, onde seu DNA circular aberto é fechado. O DNA fechado é então traduzido pelas enzimas celulares para a formação do RNA viral, o qual possui vários tamanhos. O RNA viral é transcrito para novos DNAs virais e proteínas constituintes do vírus. Após a transcrição, o RNA é encapsulado com a polimerase do HBV e o DNA de fita dupla do HBV é sintetizado formando nucleocapsídeos maduros. Os nucleocapsídeos maduros são secretados como virions ou amplificam o DNA circular existente.

Figura 3 - A. Arquitetura de domínio da polimerase do vírus da hepatite B destacando vários áreas e períodos responsáveis pelo funcionamento adequado da polimerase. **B.** Ciclo de vida do HBV desde a entrada nos hepatócitos até a geração de partículas de vírions e amplificação de DNA circular fechado covalentemente.

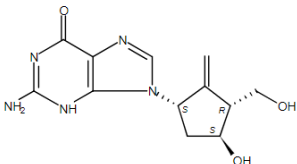


Legenda: DNA circular fechado covalentemente (cccDNA); DNA circular relaxado (DNA rc); RNA pré-genômico (pgRNA); Vírus da Hepatite B (HBV); Transcriptase reversa (RT)

Fonte: (RANGA et al., 2023)

O entecavir (ETV), 2-amino-9-[(1*S*,3*R*,4*S*)-4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metillidene-ciclopentil]-1*H*-purina-6-ona, é um dos fármacos indicados para o tratamento da infecção crônica pelo vírus da hepatite B (SHAW; LOCARNINI, 2004; YAMANAKA et al., 1999). Aprovado para uso em 2005, pela *Food Drugs and Administration* (FDA), o ETV é um antiviral análogo da 2-desoxiguanosina com atividade seletiva contra a polimerase de DNA do vírus da hepatite B (VHB), atuando como um inibidor da transcriptase reversa nucleosídeo (ITRN). Sua maior atividade antiviral ocorre após fosforilação intracelular, gerando um metabólito ativo na forma de trifosfato que inibe todos os estágios das atividades enzimáticas para replicação viral inibindo seletivamente a iniciação da polimerase do DNA-VHB, a transcrição reversa do DNA da cadeia negativa do RNA mensageiro e a síntese do DNA da cadeia positiva. Embora seja um antirretroviral, apresenta baixa atividade de inibição contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SHAW; LOCARNINI, 2004; YAMANAKA et al., 1999). As doses recomendadas são de 0,5mg/dia a 1,0 mg/dia para doença hepática compensada e doença hepática descompensada, respectivamente. Cerca de 68 a 73% do fármaco é eliminado na forma inalterada pelos rins, sendo a depuração renal independente da dose, sugerindo que o ETV passa tanto por filtração glomerular quanto por secreção da rede tubular (SIMS; WOODLAND, 2006). É um fármaco hidrofílico e ligeiramente alcalino, conforme propriedades físico-químicas descritas no quadro 1. Desde dezembro de 2016, o Ministério da Saúde, por meio da Comissão Nacional de Incorporações de Tecnologias no Sistema Único de Saúde, atualizou o Protocolo Clínico ampliando seu uso nos casos crônicos de hepatite B.

Quadro 1 - Identificação e propriedades físico-químicas do entecavir

Número CAS	Estrutura molecular	Peso molecular	Fórmula química	Solubilidade em água 25°C	pKa	LogK _{ow}
142217-69-4		277,28 g/mol	C ₁₂ H ₁₅ N ₅ O ₃	2,4 mg/ml	8,0	-0,8

Fonte: NCBI (2022)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015, 1,34 milhão de pessoas morreram em decorrência das hepatites virais, número comparável às mortes causadas pela tuberculose e superior às causadas pelo HIV. No entanto, o número de mortes por hepatite viral está aumentando ao longo do tempo, enquanto a mortalidade por tuberculose e HIV está

diminuindo. A maioria das mortes foi relacionada a doença hepática crônica (720.000 mortes por cirrose) e câncer primário de fígado (470.000 mortes por carcinoma hepatocelular). Globalmente, em 2015, cerca de 257 milhões de pessoas viviam com a infecção crônica pelo vírus da hepatite B e 71 milhões de pessoas com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (WHO, 2017).

No período de 2000 a 2021, foram notificados 264.640 casos confirmados de hepatite B no Brasil (BRASIL, 2022a). Conforme dados apresentados na tabela 1, entre os anos de 2019 a 2021, aproximadamente 115.000 pessoas estavam em tratamento da hepatite B, que demandaram mais de 13,8 milhões de comprimidos de entecavir (BRASIL, 2022b)

Tabela 1 – Quantitativo de pessoas em tratamento da hepatite B e unidades farmacotécnicas de entecavir distribuídas no Brasil pelo Sistema Único de Saúde entre 2019 a 2021.

Ano	Pessoas em tratamento	Unidades de entecavir distribuídas
2019	37.527	3.697.650
2020	38.822	5.811.008
2021	39.334	4.369.230
Total	115.683	13.877.888

Fonte: BRASIL (2022b)

2.3 Ecotoxicologia de fármacos

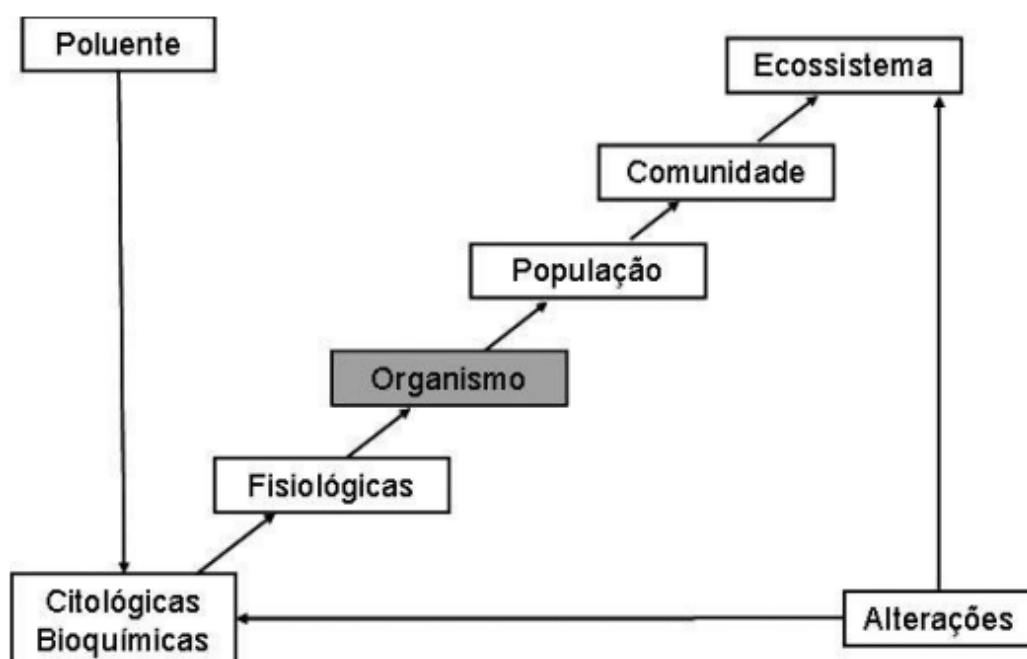
Além da importância de se avaliar os processos de tratamento de efluentes existentes para indústrias farmoquímicas e de medicamentos, para o esgoto sanitário, lixiviados de lixões e aterros sanitários, é importante se avaliar os impactos ambientais desses efluentes em organismos vivos por meio de ensaios de toxicidade (JACKSON, 2014; MAGALHÃES, D. P.; FILHO; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Assim, por meio das análises ecotoxicológicas têm-se como finalidade estudar os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado, sendo essas análises ferramentas para avaliação de impactos ambientais causados por poluentes, estimando sua toxicidade, aguda ou crônica, em relação ao organismo teste utilizado (BELDEN, 2020; SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

Desde a antiguidade até os tempos atuais, a hidrosfera constitui o compartimento mais utilizado e desenvolvido para os estudos de ecotoxicidade (MAGALHÃES, D. P.; FILHO,

2008). Devido a diversidade e características dos organismos presentes nesse compartimento, os mesmos são utilizados tanto como bioindicadores como modelos independentes para testes nos ensaios ecotoxicológico (ESTEVES, 2011; POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS; LÓPEZ-DOVAL, 2022). Assim, um bioindicador é definido como um organismo ou uma comunidade de organismos que respondem a poluição ambiental ou o acúmulo de toxinas, permitindo deprender informações sobre a qualidade do ambiente ou de suas partes (MARKERT et al., 1999). Para fornecer respostas biológicas, os bioindicadores devem possuir algumas características, tais como: (i) ser de fácil identificação taxonômica; (ii) ter ampla distribuição cosmopolita; (iii) ser encontrado em abundância; (iv) possuir sensibilidade bem reconhecida e estudada; (v) ambiente laboratorial que simule o ambiente real; (vi) protocolos e métodos bem estabelecidos e de preferência padronizados (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Em geral, inicialmente os poluentes provocam alterações bioquímico e celulares nos organismos que, aos poucos, podem evoluir para modificações na fisiologia do organismo. Essas alterações passam a ser percebidas no organismo podendo ser mais facilmente identificadas e quantificadas. Conforme a figura 4, o organismo situa-se no meio da escala hierárquica de resposta aos poluentes. Sendo assim, a resposta apresentada nesse nível antecede possíveis efeitos nas populações, comunidades e ecossistemas, podendo dessa forma ser avaliado o risco ambiental ou uma possível extinção local de grupos de organismos (JESUS; CARVALHO, 2008; MAGALHÃES, D. P.; FILHO, 2008).

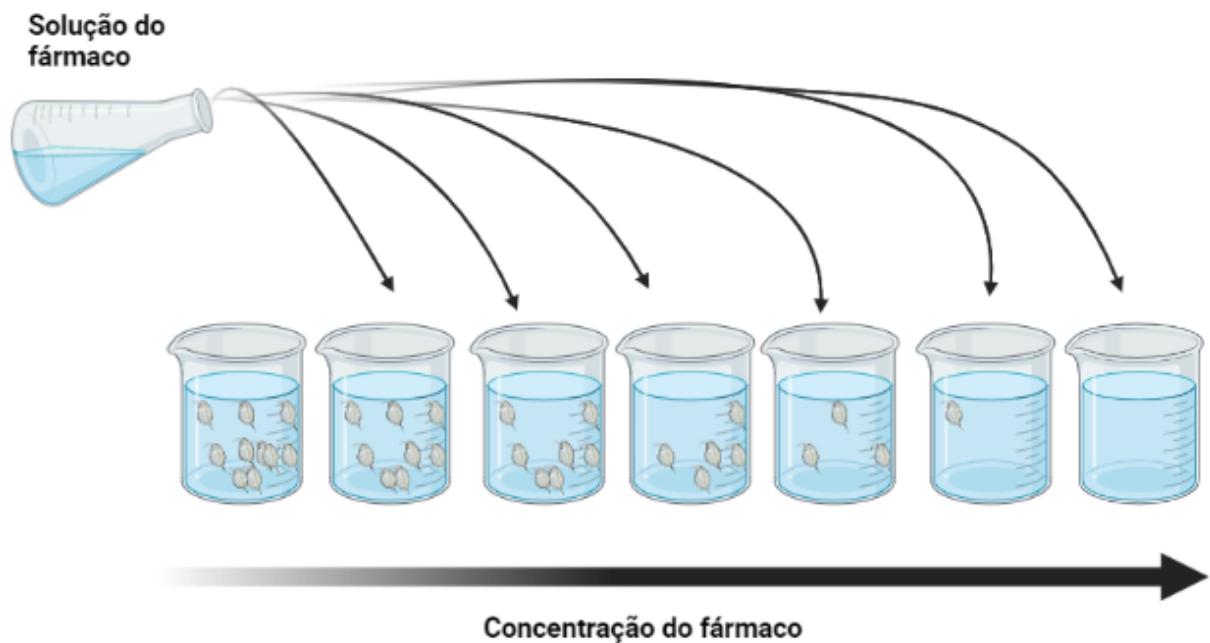
Figura 4 - Níveis de organização biológica e respostas aos efeitos de poluentes/contaminantes



Fonte: MAGALHÃES, D. P.; FILHO (2008)

No ensaio de toxicidade aguda avalia-se os efeitos da (s) substância (s) sobre os organismos em um curto espaço de tempo, pois esses efeitos são resultados de um contato único ou múltiplos contatos em um prazo de 24h a 96h. Os parâmetros avaliados, geralmente são a mortalidade ou imobilidade, bem como as alterações metabólicas ou em reações bioquímicas. Os resultados desses testes podem ser expressos como CL_{50} (concentração letal média), CE_{50} (concentração efetiva média), CI_{50} (concentração inibitória média) e DL_{50} (dose letal média), isto é, a concentração da substância que causa a morte, imobilidade ou a inibição de crescimento a 50% dos organismos-teste depois de um tempo específico de exposição (GAZOLA, 2020; NICHOLLS, 1993). De modo geral, os estudos de ecotoxicidade aguda podem ser exemplificados conforme a figura 5.

Figura 5 – Esquema de realização do teste de toxicidade aguda baseado em modelo biológico de microcrustáceo



Legenda: Concentração do fármaco aumenta no sentido da seta

Fonte: Próprio autor

Os testes de toxicidade crônica avaliam os efeitos da exposição em longo prazo às substâncias estudadas, compreendendo todo o seu ciclo de vida ou parte dele. Eles são usados para a avaliação de doses subletais, como por exemplo, para a avaliação de um efluente tratado, visto que a exposição dos organismos a baixas concentrações não elimina o risco de efeitos

deletérios (COSTA et al., 2008). O principal objetivo com esses testes é compreender quais são os efeitos sobre o ciclo da vida dos organismos, como por exemplo, se há distúrbios nas funções biológicas (reprodução, desenvolvimento de ovos e maturação) em longo prazo. Além disso, são úteis para o estudo da capacidade de bioacumulação dos poluentes e do potencial carcinogênico e mutagênico (ZENKER et al., 2014). Diante disso, a avaliação da toxicidade crônica é importante para complementar o teste de toxicidade aguda, a fim obter informações adequadas a respeito dos agentes estudados. Os testes de toxicidade crônica são realizados em períodos de sete a 21 dias. Além da CE_{50} , os resultados geralmente são expressos como CENO (concentração de efeito não observado), maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo, nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste, e CEO (concentração de efeito observado), menor concentração de agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste, porém os resultados podem ser expressos como CE_{50} (GAZOLA, 2020; NICHOLLS, 1993).

O aumento de poluentes persistentes nos ecossistemas aquáticos tem levado a necessidade de melhor compreensão e avaliação dos efeitos biológicos desses contaminantes na biota aquática. Para tanto, são utilizados modelos biológicos, de diferentes níveis tróficos, como ferramentas funcionais para avaliar a toxicidade de uma larga variedade de compostos, incluindo fármacos. Dentre os modelos, há vários estudos envolvendo cianobactérias, algas, bactérias, fungos, protozoários, crustáceos, moluscos, peixes e plantas, além de células cultivadas de mamíferos (KAR et al., 2020). No entanto, em virtude da complexidade do meio ambiente que, além de diversos organismos que podem ou não interagir entre si, há uma variedade de substâncias agindo como toxicante, nutriente ou mesmo de forma inerte, sendo impossível generalizar os resultados no nível do ecossistema com testes laboratoriais de bancada, pois esses ensaios geralmente são limitados a um organismo de teste específico por vez (CAMPANA; WLODKOWIC, 2018; COSTA et al., 2008; REICHEL-T-BRUSHETT, 2012). Assim, a expansão de novos modelos biológicos não convencionais, como o uso do caramujo *Biomphalaria glabrata*, pode contribuir de forma promissora para compreender novas variáveis que o modelo, em virtude de suas características, pode fornecer ao conhecimento científico (SOUZA-SILVA et al., 2023b).

Atualmente, diversos órgãos de proteção ambiental trabalham para o desenvolvimento e padronização desses testes com a finalidade de organizar estratégias de proteção ambiental. Como organizações internacionais empenhadas nesse trabalho, podem ser citadas a *United*

States Environmental Protection Agency (US EPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Association of Analytical Communities (AOAC) e International Organization for Standardization (ISO). No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é responsável pelo desenvolvimento e padronização de protocolos de testes toxicológicos e, além dela, a CETESB também realiza alguns trabalhos de padronização (NICHOLLS, 1993). A legislação ambiental brasileira estabelece para os testes ecotoxicológicos a realização em mais de uma espécie da biota aquática, preferencialmente pertencentes a diferentes níveis tróficos, como produtores, consumidores primários e consumidores secundários. Além dos organismos de diferentes níveis tróficos, podem ser utilizados também os decompositores, como bactérias e rotíferos (NICHOLLS, 1993). Na legislação brasileira, as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) RE 357/2005 e RE 430/2011 estabelecem a possibilidade de uso de indicadores biológicos, testes de toxicidade para interações de compostos não listados na resolução, além da realização de ensaios ecotoxicológicos em efluentes utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes. No quadro 2, é possível ver a lista das principais normas brasileiras para testes ecotoxicológicos aquáticos (ABNT, 2022; CONAMA, 2005; 2011).

Quadro 2 - Testes de Ecotoxicologia aquática padronizados no Brasil

Efeito	Organismo	Espécie	Nível trófico	Normas em vigor
Crônico	Peixe	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Consumidor secundário	ABNT NBR 15499:2022
Agudo	Peixe	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Consumidor secundário	ABNT NBR 15088:2022
Agudo	Crustáceo	<i>Daphnia similis</i> , <i>Daphnia magna</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 12713:2022
Agudo	Crustáceo	Anfípodos	Consumidor primário	ABNT NBR 16638:2021
Agudo	Crustáceo	<i>Artemia sp</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 16530:2021
Crônico	Alga	Microalgas marinhas	Produtor	ABNT NBR 16181:2021
Agudo	Crustáceo	Copépodos marinhos	Consumidor primário	ABNT NBR 16723:2021
Agudo	Bactéria	<i>Aliivibrio fischeri</i>	Decompositor	ABNT NBR 15411:2021
Crônico	Crustáceo	<i>Hyalella sp</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 15470:2021

Crônico	Equinodermo	<i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .	Consumidor primário	ABNT NBR 15350:2020
Crônico	Alga	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i>	Produtor	ABNT NBR 12648:2018
Agudo	Crustáceo	<i>Misideos</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 15308:2017
Crônico	Crustáceo	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 13373:2016
Agudo	Molusco bivalve	<i>Perna perna</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 16456:2016
Agudo	Crustáceo	Anfípodos marinhos	Consumidor primário	ABNT NBR 15638:2015

Fonte: Próprio autor

Variadas classes e tipos de fármacos foram estudadas em relação a ecotoxicidade, dentre essas antimicrobianos, antineoplásicos, hormônios e antivirais devidos a suas características farmacológicas, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos devido ao grande volume de produção e consumo desses medicamentos (KAR et al., 2020). Estudos relatados por Jain (2013) apontaram a ocorrência de antivirais em corpos aquáticos, sem, no entanto, relacioná-los a estudos ecotoxicológicos. Outro estudo de revisão, apresentado por Godoy; Kummrow (2017), identificou 65 artigos publicados no período de 2000-2017 referentes a ecotoxicologia de fármacos, porém nenhum com menção a antivirais. O trabalho de Nannou *et al.* (2020) relatou a ocorrência de 50 estudos sobre a detecção de antivirais em 16 países até o ano de 2018, com destaque para alguns estudos ecotoxicológicos com oseltamivir. Destaca-se ainda, o estudo de Silva (2019) no qual foi avaliada a toxicidade ambiental e a degradação do antirretroviral fumarato de tenofovir desoproxila, tendo sido conduzido na Faculdade e Farmácia da UFMG e na Fundação Ezequiel Dias (FUNED). No artigo de revisão de Souza *et al.* (2022) foram apontados apenas quatro estudos envolvendo antirretrovirais e ecotoxicologia. Destaca-se a transparência das informações da plataforma sueca fass.se que apresenta os resultados de estudos ecotoxicológicos realizados pelo detentores dos registros dos medicamento no país (SOUZA et al., 2022). Esses números, quando comparados a estudos relacionados a outras classes de fármacos, evidenciam uma carência de estudos ecotoxicológicos para os antivirais.

De acordo com modelos ecotoxicológicos para avaliação da toxicidade em ambientes aquáticos apresentados por Sanderson (2004), citado por Kar (2020), os antivirais estão entre

as classes de fármacos mais tóxicos, além dos sedativos, antidepressivos, anti-hipertensivos e outros.

Nesse sentido, o estudo de ecotoxicidade de fármacos torna-se de extrema importância para compreender os impactos sobre os seres vivos, principalmente nos ecossistemas aquáticos. A diversidade de estudos, com diferentes fármacos e organismos, pode contribuir para a construção de um padrão analítico a fim de facilitar o entendimento e as comparações.

2.3.1 Modelos ecotoxicológicos

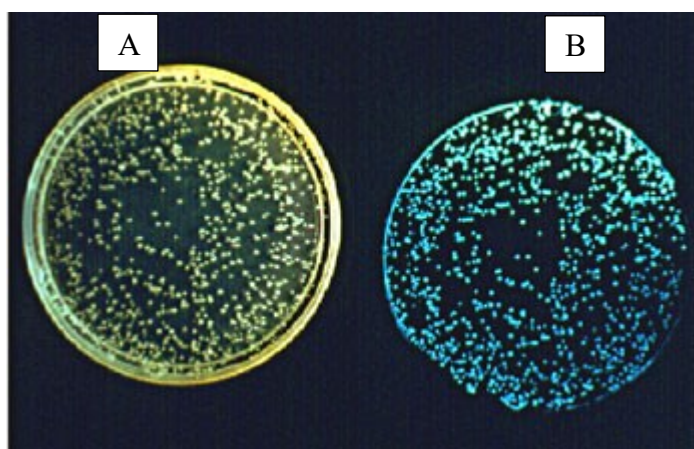
No Brasil, a maior parte dos estudos ecotoxicológicos utilizam organismos exóticos, como a *Daphnia magna* e a *Daphnia smilis*, na avaliação dos efeitos tóxicos de contaminantes aquáticos. As escolhas de modelos biológicos exóticos estão relacionadas ao fato da existência de normativas estabelecidas em outros países e organizações, o que facilita tanto a execução dos testes, o cultivo dos organismos e a comparação entre os autores e estudos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). O princípio dos ensaios ecotoxicológicos consiste na obtenção de dados por meio de uma espécie modelo, os quais são extrapolados para as demais que habitam um determinado ambiente. Diferenças de sensibilidade entre espécies exóticas provenientes das zonas temperadas e, nativas provenientes das zonas tropicais, devem ser avaliadas do ponto de vista ecológico, da proximidade realística dos ecossistemas e seu valor econômico. Essas variáveis são algumas das razões que devem ser consideradas ao priorizar o uso de espécies nativas em ambientes tropicais (MARTINS; BIANCHINI, 2011). Martins e Bianchini (2011), reforçam a necessidade de pesquisadores das diferentes regiões do Brasil, escolherem espécies nativas como organismo, o que deve incidir em maior representatividade de suas pesquisas. Ainda segundo esses autores, o uso de espécies nativas e outras vias de exposição, são indispensáveis para o estabelecimento dos padrões de qualidade de águas, mais condizentes com as características ambientais e sociais do Brasil. No entanto, há o risco de que, somente o uso de espécies nativas para fins acadêmicos pode estar sujeito a maiores chances de recusa de manuscritos (SARMA; NANDINI, 2006). Assim, a recomendação é utilizar nos estudos ecotoxicológicos tanto espécies nativas, quanto as espécies já estabelecidas nas normas e protocolos internacionais (SARMA; NANDINI, 2006).

2.3.1.1 *Aliivibrio fischeri*

Aliivibrio fischeri é um bacilo gram-negativo, heterotrófico, com produção de bioluminescência por meio da expressão de enzima luciferase, encontrado em ambientes marinhos, na forma livre ou em mutualismo com lulas e peixes (Figura 6) (MADIGAN et al.,

2010; NORSWORTHY; VISICK, 2013; VERMA; MIYASHIRO, 2013). Em virtude de sua característica bioluminescente vem sendo amplamente utilizada em estudos ecotoxicológicos com fármacos, metais traços, efluentes e monitoramento de bacias hidrográficas (ISHAQUE et al., 2006; WANG et al., 2016; WLODKOWIC; KARPIŃSKI, 2021). Os testes são rápidos e baseiam-se na propriedade de xenobióticos de afetarem o metabolismo ou comprometerem a viabilidade bacteriana, refletindo na alteração da emissão de luminescência (ABBAS et al., 2018).

Figura 6 – Fotografia de *Aliivibrio fischeri*

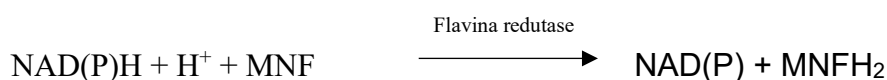


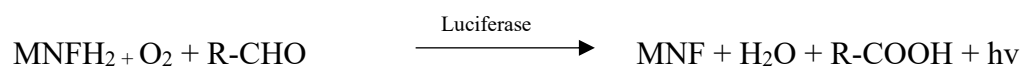
Legenda: A – *A. fischeri* sob luz natural; B – *A. fischeri* em câmara escura

Fonte: NSF (1975)

A bioluminescência, um tipo de reação de quimioluminescência, é desencadeada por catálise enzimática cuja produção de luz é diretamente proporcional a atividade metabólica, sendo que, a inibição da atividade enzimática causa uma diminuição na intensidade da bioluminescência (ABBAS et al., 2018; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006).

O mecanismo bioquímico da luminescência em *A. fischeri* ocorre por meio da redução do mononucleotídeo de flavina (MNF) por meio da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NAD(P)H) por ação da enzima flavina redutase, formando o mononucleotídeo de flavina reduzida (MNFH₂). Por ação do oxigênio molecular, o MNFH₂ na presença de aldeído e da enzima luciferase, a reação oxidativa da molécula produz novamente o MNF, água, ácido carboxílico e a emissão de luz (hv).





Cada cubeta de teste contém 1×10^6 indivíduos. O procedimento básico do teste consiste na mistura de 1,5 mL de suspensão bacteriana com igual quantidade da solução teste a qual deve ser preparada em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 2%, acompanhada do controle negativo (Suspensão de bactéria e solução salina sem a substância teste). A temperatura padronizada para as soluções e suspensão é de 15 °C sendo o tempo para leitura da luminosidade de 5, 15 ou 30 minutos (ABNT, 2021). A adição de solventes orgânicos como metanol ou etanol com concentrações inferiores a 1,5% pode ser utilizada seguida da diluição com a solução salina a 2%, porém, esses solventes podem afetar a determinação da toxicidade, mesmo em concentrações estatisticamente insignificantes. A diminuição da luminescência (INH) pode ser determinada por meio da fórmula:

$$\text{INH } \% = 100 - \left(\frac{\text{IT}_T}{\text{IT}_0 \times \text{KF}} \right) \times 100$$

$$\text{KF} = \frac{\text{IC}_T}{\text{IC}_0}$$

Onde, IC_0 e IT_0 são a luminescência do controle e da amostra de teste em $t = 0$. IC_T e IT_T são valores de luminescência para amostras de controle e teste medidos após o tempo de exposição ' T ' minutos e KF é o fator de correção com base no controle/em branco (PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006).

Os resultados são expressos em concentração efetiva da amostra, em mg/L, que causa 50% na redução de luminescência (CE_{50}) (ABBAS et al., 2018; ABNT, 2021a; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006).

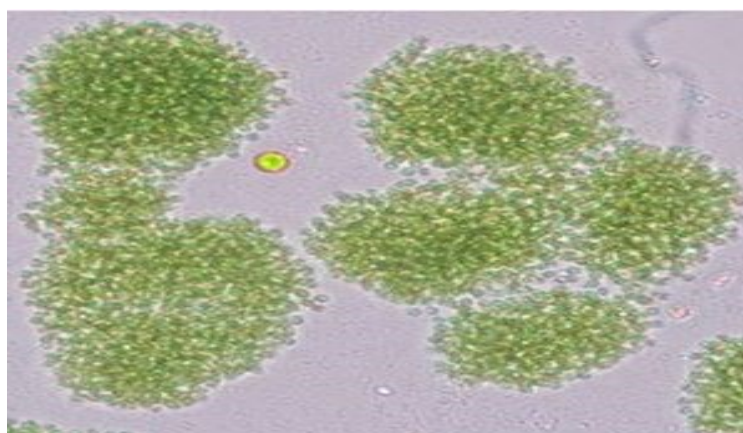
2.3.1.2 *Microcystis novacekii*

Pertencente à classe das cianofíceas, são microrganismos procariontes (bactérias), de pequeno diâmetro, possuindo vesículas de gás (também sem bainhas individuais), que se organizam em pequenas colônias mas perdem a regularidade esférica ao longo do tempo (Figura 7) (RIBEIRO; FERREIRA; TIAGO, 2010). Possuem retículo endoplasmático rudimentar localizado em membranas, chamadas de tilacóides. Os tilacóides possuem diferentes pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila (responsável pela coloração esverdeada), sendo considerados produtores primários de energia (fotossíntese). São autotróficos e apresentam pequenas exigências nutricionais, alta capacidade de fotossíntese e de assimilação de nitrogênio. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias

inorgânicas e luz (HARKE et al., 2016). No entanto, na presença de substâncias orgânicas, podem utilizá-las como fonte de energia. Exercem papel importante na manutenção do equilíbrio ambiental, pois constituem o fitoplâncton nos mais variados ambientes aquáticos, sendo a base da cadeia alimentar. Estão presentes mesmo em condições inóspitas como em desertos, geleiras e águas sulfurosas (FIORANTE, 2013; FIORAVANTE et al., 2010).

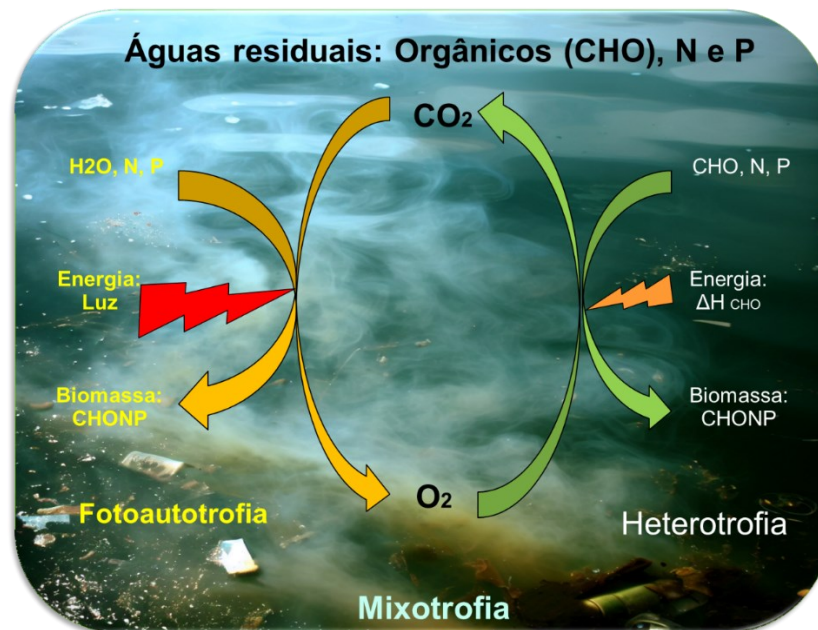
As cianobactérias ocupam uma posição taxonômica única, uma vez que combinam um modo autotrófico de crescimento, comum para as células vegetais eucariotas, com um sistema metabólico geralmente considerado bacteriano, essa característica denominada mixotrofia, possibilita às cianobactérias um crescimento não estritamente dependente da intensidade de luz nos cultivos, bem como o uso de variadas fontes de carbono dependendo da aplicação da biomassa produzida e dos recursos disponíveis. A figura 8 apresenta a síntese do processo de mixotrofia. Assim, as cianobactérias podem crescer por meio da fotossíntese ou por captação de matéria orgânica do ambiente (FERREIRA, 2013; MA et al., 2006; NIRMALAKHANDAN et al., 2019).

Figura 7 – Fotografia de colônias de *Microcystis novacekii*



Fonte: LKCNH (2015)

Figura 8 - Esquema do processo mixotrófico para utilização de poluentes em águas residuais [Orgânicos (CHO), N e P] com a luz como fonte de energia em fotoautotrofia e/ou de orgânicos com $[\Delta H]$ em heterotrofia



Fonte: Adaptado de NIRMALAKHANDAN et al. (2019)

A *M. novacekii* possui ampla distribuição geográfica e está presente na Europa, Oceania, América do Sul, Oriente Médio e Ásia (GUIRY, 2022). Pode ser encontrada em rios, lagos, reservatórios, tanques, estando eles poluído ou não (CRISTINA; ROLLEMBERG, 2004; WHITTON; POTTS, 2002). Devido a sua importância nos ecossistemas, sua capacidade de bioacumulação e degradação de poluentes, além de um importante indicador de poluição de meios aquáticos, esses organismos têm potencial para a avaliação consistente dos níveis de poluição de diferentes substâncias e de uso estruturado em plantas de tratamento de efluentes (CAMPOS et al., 2013; FIORAVANTE et al., 2010; XIAO; LI; REYNOLDS, 2018).

Estudos mostram a capacidade de degradação de fármacos e agrotóxicos presentes no meio aquático pela ação de cianobactérias do gênero *Microcystis* sem a geração de metabólitos ativos ou tóxicos (CAMPOS et al., 2013; FIORAVANTE et al., 2010, 2012; SILVA et al., 2019). Considerando as características mixotróficas das *Microcystis*, esses organismos podem utilizar em seu metabolismo substrato carbono de origem orgânica e/ou inorgânica além de obter energia por meio de fontes orgânicas e/ou da luz (NIRMALAKHANDAN et al., 2019). Para fins de degradação de poluentes orgânicos, a utilização do carbono orgânico pelo processo de osmotrofia é relevante nos seres mixotróficos (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013).

Em linhas gerais, os estudos de ecotoxicidade e de degradação de substâncias com cianobactérias podem ser realizados da seguinte forma:

1. Para a ecotoxicidade, o método padronizado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD 201) estabelece a avaliação do crescimento de microalgas de água doce e/ou cianobactérias sob efeito de substância exógenas por um período de 72 horas. O efeito a ser observado é a redução do crescimento em uma série de culturas de algas expostas a várias concentrações de uma substância de teste em função do tempo e concentração comparados com uma cultura controle na qual as cianobactérias não são expostas a substância teste. O crescimento e a inibição do crescimento são quantificados a partir de medições da biomassa de algas em função do tempo. A biomassa de algas é definida como o peso seco por volume, por ex. mg de algas/litro de solução de teste ou a contagem de células que pode ser feito com uso de curva de crescimento da cepa específica medidas por meio de espectrofotometria do UV. O ponto final do teste é a inibição do crescimento, que produz uma inibição especificada de x% da taxa de crescimento (por exemplo, 50%) é determinada, descrita e expressa como concentração inibitória média (CI₅₀). Além disso, a menor concentração com efeito observado (LOEC) e a concentração sem efeito observado (NOEC) podem ser determinadas estatisticamente (OECD, 2006).
2. Para os estudos de remoção de substância teste são utilizadas concentrações inferiores a concentração LOEC. As cianobactérias ficam exposta as condições ótimas de crescimento, sob ação da luz, temperatura e agitação por um período de 14 dias. Amostras são retiradas no decorrer do tempo para quantificação das células e da substância teste. Ao final do período de exposição observa-se o quanto do fármaco foi removido. Para comparação é realizado um controle contendo apenas a substância teste dissolvida na mesma matriz de meio de cultura para avaliar possível degradação ocorrida por meio de hidrólise ou fotodegradação (SILVA et al., 2022).

2.3.1.3 *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um crustáceo zooplactônico, branquiópodes, que pertence a ordem anostraca (sem carapaça), popularmente conhecida como camarões de salmoura, que vive em regiões litorâneas e lagos com hipersalinidade, suportando variações de salinidade de 5 g/L a 250 g/L além de temperaturas de 6°C a 35°C (NTUNGWE et al., 2020; NUNES et al., 2006). Fotografia de indivíduos adultos está apresentada na figura 9. Caracteriza-se como consumidor

primário, alimentando-se principalmente de algas, atua como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores. (LAVENS; SORGELOOS, 1996; LO NOSTRO et al., 2015). Alimenta-se por filtração da água de forma não seletiva e podem ingerir diretamente partículas menores que 50 μm (Hund-Rinke; Simon, 2006; Nemati; Sarkheil; Johari, 2019; Zhu et al., 2017). Com predominância de reprodução partenogênica, possui distribuição cosmopolita e grande dispersão do gênero pelo mundo em enormes populações (NTUNGWE et al., 2020).

Figura 9 - Fotografia de *Artemia salina* adulta



Fonte: (ASRN, 2005)

A vida da *A. salina* está diretamente relacionada a capacidade de locomoção, pois suas brânquias ciliadas funcionam para a captação de oxigênio do meio aquático e também para a ingestão, por meio da filtração, dos alimentos. Para substâncias insolúveis, podem atuar como vetores da bioacumulação de contaminantes ambientais, uma vez que aumentam o risco do fenômeno de biomagnificação em peixes e outros organismos da cadeia trófica que utilizam *A. salina* como base alimentar (BERGAMI et al., 2016; FOLEY et al., 2018; NUNES et al., 2006), no entanto, para substâncias solúveis não há consenso sobre essa possibilidade (IBELINGS et al., 2005).

Nos estudos ecotoxicológicos, o gênero *Artemia* é amplamente utilizado para avaliação dos mais variados contaminantes, como efluentes, substâncias inorgânicas, fármacos, extratos de naturais e defensivos agrícolas (LIBRALATO et al., 2016). A ampla utilização está associada as seguintes características desse modelo biológico: (I) tempo reduzido para realização do teste (de 24–72 h desde a eclosão dos cistos até o primeiro ponto final); (II) custo-

efetividade; (III) disponibilidade de cistos comerciais (ovos) promovendo homogeneidade da população com disponibilidade a qualquer tempo, sem a necessidade de cultivo; (IV) bom conhecimento de sua biologia e ecologia; (V) fácil manipulação e manutenção em condições de laboratório; (VI) corpo pequeno permitindo acomodação em pequenos béqueres, tubos de ensaio ou microplacas; (VII) alta adaptabilidade a várias condições de teste; (VIII) nenhuma alimentação necessária durante o teste (KOKKALI; KATRAMADOS; NEWMAN, 2011; NUNES et al., 2006).

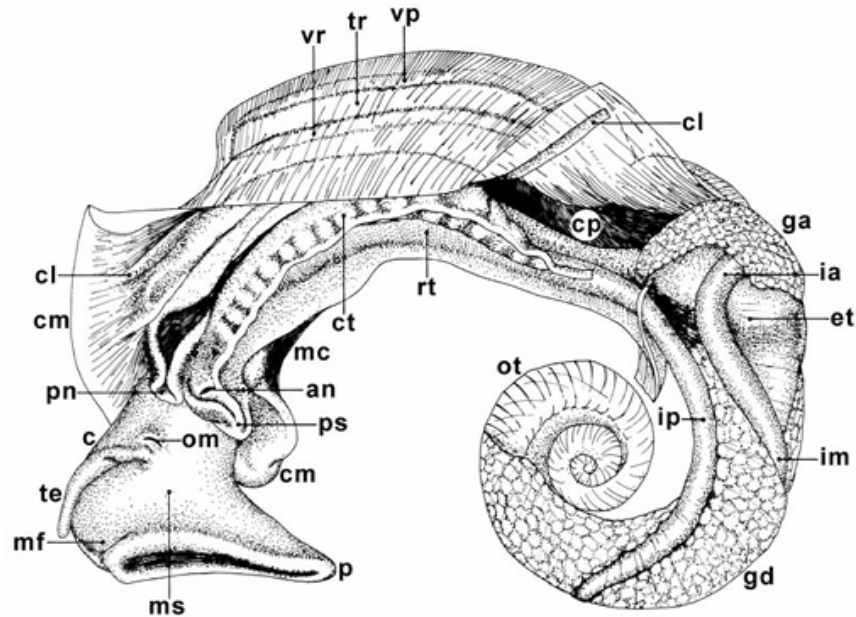
O método de análise consiste na exposição de náuplios com 24 horas de vida a concentrações seriadas da substância teste. Após 48 horas são observados no número de indivíduos imóveis por um período de 10 segundos (mortos) (ABNT, 2021).

2.3.1.4 *Biomphalaria glabrata*

Biomphalaria glabrata é um caracol de água doce pulmonado, hermafrodita, pertencente à família *Planorbidae*. É um herbívoro generalista que se alimenta de, bactérias, algas, vegetais, fragmentos de animais e vegetais em decomposição em condições naturais raspando o substrato com a rádula (THOMAS; NWANKO; STERRY, 1985). Quando adultos, eles geralmente têm uma concha com um diâmetro máximo de 40 mm e 11 mm de largura, enrolado em espiral à esquerda (BRASIL, 2008).

O sistema digestivo dos caramujos é constituído pela boca, mandíbula, rádula, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus (Figura 10). Como consequência da ação de enzimas advindas do esôfago e do ceco digestivo, a digestão extracelular se inicia no estômago e encerra no reto, com a produção e armazenamento das fezes (BRASIL, 2008). A rádula constitui seu principal órgão para obtenção de alimentos pelo processo de raspagem. Isso propicia a ingestão de substâncias e elementos insolúveis como o limo o qual contém algas, bactérias, outros microrganismos, matéria orgânica e sais minerais (BRASIL, 2008).

Figura 10 – Morfologia do *Biomphalaria glabrata*



Biomphalaria: animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).

Fonte: BRASIL (2008)

B. glabrata é um molusco comumente estudado sob o aspecto epidemiológico de saúde por atuar como hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Brasil, 2008; Tallarico *et al.*, 2014). Entretanto, estudos ecotoxicológicos utilizando este organismo têm crescido nos últimos anos (BAYNES *et al.*, 2019; DE SIQUEIRA *et al.*, 2021a; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2016; SULLIVAN; CASTRO, 2005; WANG *et al.*, 2022). Esta espécie possui ampla distribuição no território brasileiro, além de outras regiões tropicais, baixa dispersão e pode ser facilmente coletada, o que a torna um bom organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (SOUZA-SILVA *et al.*, 2023b; TALLARICO *et al.*, 2014). Outras características como, alta capacidade reprodutiva, sensibilidade a mudanças no meio ambiente, possibilidade de avaliar resposta frente a exposição a substâncias solúveis e insolúveis, possuir um período embrionário curto e amplamente descrito na literatura, favorecem a utilização desse modelo biológico nos estudos ecotoxicológicos (CAIXETA *et al.*, 2022; SOUZA-SILVA *et al.*, 2023b).

O *B. glabrata*, apresentado na figura 11, pode colonizar uma grande variedade de habitats tanto lóticos (desde rios até pequenas valas) quanto lênticos (de lagoas a pequenas poças) (Brasil, 2008)

Figura 11 – Fotografia de um exemplar de *Biomphalaria glabrata*



Fonte: FIOCRUZ (2017)

Em 2017, pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) concluíram o sequenciamento genético do *B. glabrata*. Esse resultado trouxe informações importantes sobre a biologia do molusco além de aspectos da percepção sobre respostas ao estresse, função imune e regulação da expressão gênica. O tamanho estimado do seu genoma é 916 Mb e é composto por dezoito cromossomos (ADEMA et al., 2017). Esse sequenciamento permitiu conhecer melhor não apenas o molusco, mas também as informações relacionadas ao imunobioma e melhorar nossa compreensão da base mecanicista da imunidade dos gastrópodes (CASTILLO et al., 2020).

Mesmo apresentando algumas diferenças, esse molusco possui uma resposta de defesa inata semelhante ao dos vertebrados, capazes de reconhecer e destruir patógenos (ABAZA et al., 2016; HELAL et al., 2014). Devido ao crescente conhecimento científico, tanto do sistema imunológico quanto reprodutor, esse molusco é alvo de pesquisas de ecotoxicidade envolvendo agrotóxicos, esgoto, efluentes industriais e metais traços (DE SIQUEIRA et al., 2020, 2021b; DOUGLAS; SULLIVAN, 1992; OLIVEIRA-FILHO et al., 2016; SULLIVAN; CASTRO, 2005; TALLARICO et al., 2004)

2.3.1.5 Estudos de toxicidade com *Biomphalaria glabrata*

Não há uma padronização para testes ecotoxicológicos utilizando o modelo biológico *B. glabrata* estabelecidos por agências governamentais, não governamentais e academias. Mas

há uma tendência na utilização dos moluscos com certas características, tempo de exposição e avaliação de desfechos. Souza-Silva et al (2023), com base nos diversos estudos publicados na literatura científica, propuseram uma proposta de critérios para realização de estudos ecotoxicológicos. Os estudos podem ser realizados utilizando indivíduos adultos, recém-nascidos, embriões ou células de defesa (hemócitos). O tempo de exposição a substância teste pode variar de 24 horas para testes agudos a 35 dias para os testes crônicos. Os desfechos como mortalidade, bioacumulação, alteração no comportamento, alterações morfológicas, tempo de eclosão dos ovos, alterações metabólicas, alterações na capacidade fagocitária dos hemócitos além de alterações no DNA podem ser observadas e quantificadas (Souza-Silva *et al.*, 2023).

Diferentemente dos estudos para substâncias moluscidas que utilizam indivíduos adultos de *B. glabrata*, para os estudos ecotoxicológicos são utilizados modelos biológicos nos seus primeiros estágios de vida. Nessa fase há maior sensibilidade aos xenobióticos proporcionando menores custos e rapidez nas repostas (MOHAMMED, 2013). Corroborando com essa premissas, os protocolos de teste existentes da ABNT 12713 (Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp*), ABNT 16530 (Teste de imobilização aguda de *Artemia salina*), da OECD 202 (Teste de imobilização aguda de *Daphnia spp*) e OECD 210 (Teste de toxicidade para peixes e seus estágios iniciais de vida), recomendam o uso de estágios iniciais da vida para testes de toxicidade. Em virtude da sua evolução biológica, indivíduos jovens de *B. glabrata* (concha com 3 a 5 mm) e adultos apresentam mecanismos de defesa contra xenobióticos que pode inviabilizar estudos ecotoxicológicos, como sistema imunológico inato e adaptativo, a capacidade de formação de lamelas, emigração espontânea da água e dormência persistente em ambientes sob condições adversas (BRASIL, 2014). Por isso, o presente estudo optou por utilizar indivíduos recém-nascidos para os estudos ecotoxicológicos.

2.4 Remoção de fármacos por processo oxidativo avançado e por ação de cianobactérias

2.4.1 Processos Oxidativos Avançados no tratamento de efluentes

A reação de Fenton é conhecida desde o século XIX, quando em 1894, Henry J. Fenton observou a oxidação do ácido tartárico na presença de H_2O_2 e íons ferrosos (FENTON, 1894). Entretanto, somente 40 anos mais tarde foi proposto o mecanismo de geração de radical hidroxila que ocorre por meio da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio em meio ácido, como mostra a Equação 1 (HABER et al., 1934).

Os Processos Oxidativo Avançados (POAs), tem se destacados como uma alternativa adicional aos processos biológicos de tratamento convencionais de efluentes que utilizam em sua maioria sistema RAFA, sistema de lodos ativados ou sistema aeróbico de lagoas, esse último com demanda extensões construtivas e tempo considerável para a degradação dos compostos pela ação de microrganismos.

A reação de Fenton e o processo de Foto-Fenton promovem a degradação química de diversas substâncias por meio da geração e ação de radicais hidroxila (HO•). Conforme apresentado na tabela 2, esse radical possui potencial de oxidação elevado, da ordem de +2,8 V, superior aos dos oxidantes convencionais e menor apenas para o potencial de oxidação do flúor (+ 3,03 V) (PARSONS, 2005).

Tabela 2 - Potencial de oxidação de substâncias/espécies oxidantes.

Substância / espécie	Fórmula molecular	Potencial de oxidação (E°/V)
Fluor	F ₂	3,03
Radical hidroxila	HO•	2,80
Oxigênio atômico	O	2,42
Ozônio	O ₃	2,07
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	1,78
Radical perhidroxila	H ₂ O•	1,70
Permanganato	MnO ₄ ⁻	1,68
Ácido hipobromoso	HBrO	1,59
Dióxido de cloro	ClO ₂	1,57
Ácido hipocloroso	HClO	1,49
Cloro	Cl ₂	1,36

Fonte: HAYNES (2014; PARSONS (2005)

A formação dos radicais hidroxila ocorre por meio da reação de íons ferrosos e peróxido de hidrogênio em meio ácido, altamente reativos, que reagem com os compostos químicos,

incluindo fármacos, de forma não seletiva, oxidando-os e produzindo compostos menos tóxicos ou inativos. Assim, dependendo das características do efluente ou água residual a ser tratada, pode ser utilizado associado ou não aos métodos biológicos (MARCELINO et al., 2013). Em geral, o POA é utilizado como pré-tratamento do efluente para aumentar a biodegradabilidade das substâncias, tornando-os menos tóxicos e mais degradáveis pelos microrganismos da etapa posterior de tratamento biológico (JIN; ZHANG; ZHENG, 2014; RODRIGUEZ et al., 2002; SARRIA et al., 2003).

Conforme demonstrado no quadro 3, existem diversas formas de se gerar radicais hidroxila utilizando-se da combinação de agentes oxidantes, catalizadores e/ou irradiação. Os sistemas para geração de radicais oxidantes são classificados em homogêneos quando apresentam apenas uma fase e heterogêneos quando ocorrem em sistema polifásicos na presença de um catalisador sólido (BUSTILLO-LECOMPTE, 2020; HUANG; DONG; TANG, 1993).

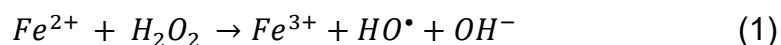
Quadro 3 - Sistemas típicos de processos oxidativos avançados

Sistema	Sem irradiação	Com irradiação
Homogêneo	O ₃ / H ₂ O ₂ O ₃ /OH ⁻ H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (Fenton)	O ₃ /UV H ₂ O ₂ /UV Feixe de elétrons US H ₂ O ₂ /US UV/US
Heterogêneo	Eletroquímico Eletro-Fenton	TiO ₂ /O ₃ /UV TiO ₂ / H ₂ O ₂ /UV

Legenda: UV-Radiação ultravioleta; US-Ultrassom

Fonte: HUANG; DONG; TANG (1993)

A mistura de (Fe²⁺) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) promove a reação espontânea de Fenton gerando o radical hidroxila (HO[•]) conforme a equação 1:

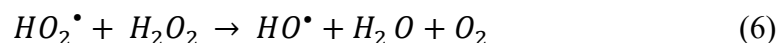
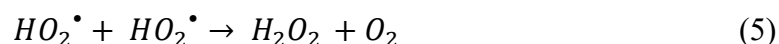
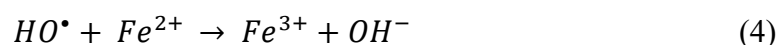
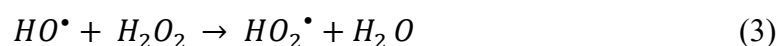


Outras reações ocorrem simultaneamente entre os reagentes e produtos da reação de Fenton que podem diminuir a eficiência da reação. A reação de Fenton é eficiente apenas na faixa de pH 2-3 (SUN; PIGNATELLO, 1992). Desequilíbrio de peróxido de hidrogênio, ferro e principalmente pH fora da faixa ideal, podem diminuir a efetividade da reação devido a formação de radicais de menor potencial oxidativo, a formação de precipitados férricos, facilitada em pH acima de três ou a diminuição da velocidade com excesso de H⁺ em pH menor

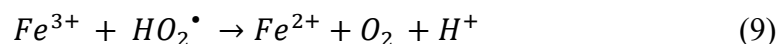
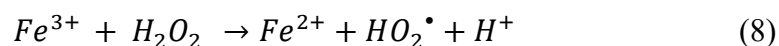
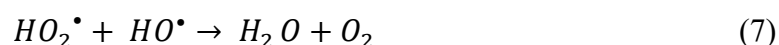
que dois devido ao sequestro de radicais hidroxila por esse cátion (PARSONS, 2005; PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006).

Para uma maior eficiência no consumo de H_2O_2 e realização do processo em pH neutro, foi desenvolvido um processo alternativo utilizando íons ferrosos complexados ao EDTA. Essa modificação no processo leva a melhor remoção dos compostos orgânicos da amostra e dispensa a correção do pH para o descarte do efluente (MESSELE et al., 2019). Além disso, em virtude do pH neutro, processos biológicos adicionais podem ser utilizados para degradabilidade final das substâncias (KAZIMIEROWICZ; DEBOWSKI; ZIELIŃSKI, 2023; MONSALVO et al., 2015)

As reações competitivas que ocorrem simultaneamente na reação de Fenton compreendem a reação do radical hidroxila com o peróxido de hidrogênio (Equação 2), formando radical hidroperoxila e água. O radical hidroperoxila reage com os íons ferrosos oxidando a íons férricos (Equação 2), com ele mesmo (Equação 5), com o peróxido de hidrogênio (Equação 6) formando novamente peróxido de hidrogênio e oxigênio além de radical hidroxila, água e oxigênio, respectivamente.



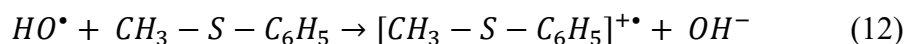
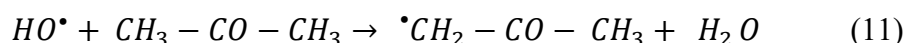
Por fim, os radicais hidroxila e hidroperóxido podem reagir entre si gerando água e oxigênio (Equação 7). Ocorre ainda a regeneração do Fe^{2+} , por meio da redução do Fe^{3+} , pela ação do peróxido de hidrogênio e o radical hidroperóxido (Equações 8 e 9) (KWAN; VOELKER, 2002).



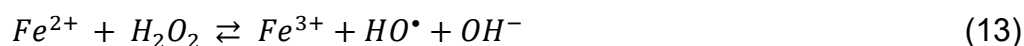
O uso de processo Fenton pode levar à mineralização completa de alguns compostos orgânicos, convertendo-os em CO_2 , H_2O e íons inorgânicos. Para isso são necessárias grandes

quantidades de reagentes, o que pode aumentar os custos do processo. Assim, com o uso equilibrado de reagentes é possível chegar à mineralização parcial de forma a reduzir a toxicidade das substâncias, aumentando sua degradabilidade. Contudo, em alguns casos os produtos gerados podem apresentar toxicidade igual ou superior à da substância original (PARSONS, 2005).

A reação dos radicais hidroxila podem ocorrer por três mecanismos: adição da hidroxila, abstração de hidrogênio e transferência de elétrons (HUANG; DONG; TANG, 1993). Compostos orgânicos contendo sistemas aromáticos ou ligações múltiplas carbono-carbono sofrem reação adicional com OH devido à rica nuvem de elétrons no anel aromático. A adição de hidroxila ocorre em compostos insaturados formando compostos alcoólicos ou fenólicos (Equação 7). A abstração de hidrogênio ocorre principalmente com compostos orgânicos insaturados e alguns saturados como aldeídos e cetonas (Equação 8). A transferência de elétrons ocorre quando há a irradiação com feixe de elétrons (Equação 9) (PARSONS, 2005).



Na presença da matéria orgânica, as reações com o reagente de Fenton podem ocorrer por meio de um mecanismo de reação em cadeia na qual a etapa limitante é a formação de radicais hidroxila (LIN; LO, 1997; MERZ; WATERS, 1949).



2.4.2 Remoção biológica no tratamento de efluentes

O tratamento biológico de substâncias orgânicas contidas nos efluentes baseia-se na capacidade dos microrganismos de metabolizar compostos orgânicos utilizando-os como fonte

nutricional. Esse processo ocorre de forma natural nos corpos d'água ou de forma otimizada nas estações de tratamento. Essa metodologia de tratamento é a mais utilizada nos efluentes sanitários e industriais devido a boa relação de custo-benefício proporcionada por essa técnica (SINGH et al., 2021).

Os principais organismos envolvidos na estabilização da matéria orgânica de efluentes e esgotos são as bactérias, além de fungos, protozoários, algas e helmintos. A utilização de bactérias heterotróficas e fungos, em processos de biodegradação, aeróbicos e anaeróbicos, são comuns nos sistemas de tratamento de água e esgoto (GAUR; NARASIMHULU; PYDISETTY, 2018).

Atualmente tem crescido o interesse no estudo e desenvolvimento de metodologias para degradação ou remoção de efluentes com o uso de cianobactérias, as quais apresentam grande ferramenta e potencial para sistemas de biodegradação (TOULIABAH et al., 2022).

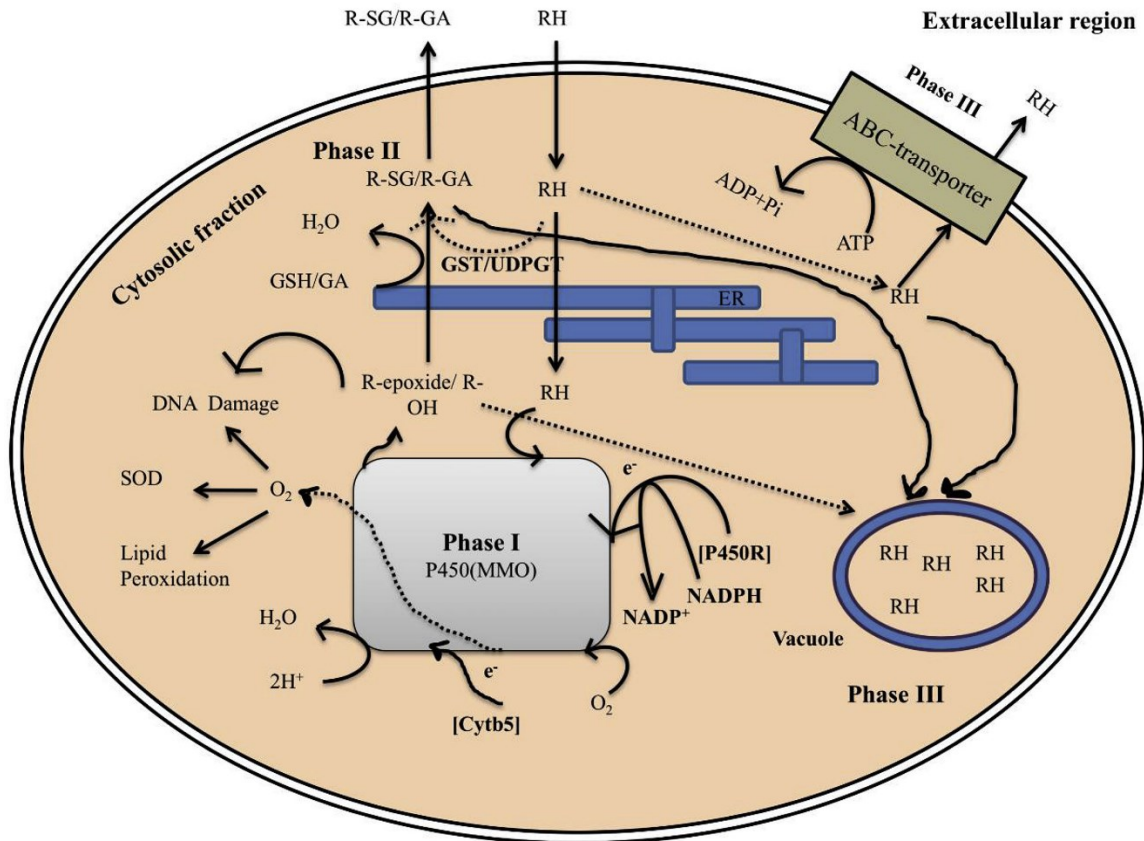
Estes microrganismos têm ampla distribuição e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência (MUSTAFA et al., 2021). As cianobactérias possuem um papel importante para a redução de poluentes orgânicos no ambiente, seja por mecanismos de bioacumulação ou por biodegradação. Estes microrganismos ocupam a base da cadeia alimentar, e podem degradar os poluentes presentes no meio, como por exemplo, na biodegradação de carbamazepina (UMMALYMA; PANDEY; SUKUMARAN, 2017)

O processo de remoção, metabolização ou biotransformação do substrato pode ser dividido em três fases, sendo as fases I e II muito semelhantes às que ocorrem no fígado dos mamíferos.

Fase I - Caracterizada pela adição de grupos funcionais reativos e pela transferência de elétrons, por meio de oxiredução ou hidrólise catalisada por enzimas microsossomais do Citocromo P450, geralmente localizadas no retículo endoplasmático (Figura 12). As enzimas monooxigenases (MO), oxidases de funções mistas (MMO), oxidases do sistema citocromo P450 (Cyt P450) catalisam esse processo oxidativo. Na redução, há o envolvimento do NADPH gerado na fotossíntese (GAUR; NARASIMHULU; PYDISETTY, 2018). O substrato (R-H) liga-se ao ferro trivalente do grupo heme da enzima MO, reduzindo-o a divalente por catálise pela flavoproteína redutase (P450R). O Oxigênio (O_2), um aceptor de elétrons, ao recebê-los forma o radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) que é rapidamente convertido em água e oxigênio radicalar. Este radical possui afinidade pelo complexo substrato-ferroso (RH)- Fe^{+2}

transformando o substrato em compostos oxidados (R-OH ou R-epóxido) (TORRES et al., 2008).

Figura 12 - Metabolismo de xenobióticos em organismos fotossintéticos. As reações de passagem são representadas por linhas pontilhadas.



Legenda – RH: Substância orgânica (xenobiótico); R-SG: conjugação do substrato oxidado com a glutadião; R-GA: conjugação do substrato oxidado com o ácido glicurônico; ER: Retículo endoplasmático; GST: Glutadião-S-Transferase; UDPGT: Difosfato de uridina glutamila transferase; MMO: Metano monooxigenase; SOD: Superóxido dismutase

Fonte: (GAUR; NARASIMHULU; PYDISETTY, 2018)

- 1) Fase II - As reações consistem na conjugação do substrato oxidado com o ácido glicurônico (R-SA) e glutadião (R-SG) para facilitar sua excreção. Grupos funcionais como carboxílicos, álcool e amina viabilizam a conjugação direta com os sistemas enzimáticos da Fase II, não passando pela Fase I. Nesta fase, as reações são catalisadas pelas enzimas: glutadião-S-transferase (GSTs) e UDP-glicuronil transferases (UDPGTs) (PFLUGMACHER; SCHRODER; SANDERMANN, 2000).

- 2) Fase III - Caracterizada pela excreção dos xenobióticos conjugados através da parede celular, presente no metabolismo das cianobactérias fotossintetizantes, podendo ocorrer ainda o armazenamento dessas substâncias em vacúolos lipídicos antes de serem excretados por meio de transporte ativo transmembrana e participação de proteínas transportadoras (GAUR; NARASIMHULU; PYDISETTY, 2018; TORRES et al., 2008).

3 OBJETIVOS

Considerando a possível presença do entecavir no ambiente aquático, um antiviral que interfere diretamente em processos enzimáticos e na síntese de proteínas, com possíveis impactos no meio ambiente e na saúde humana, e a ausência de estudos ecotoxicológicos para esse fármaco, visou-se com a presente pesquisa caracterizar as respostas agudas e crônicas do entecavir em organismos, de diferentes níveis tróficos, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*, *Microcystis novacekii* e *Alivibrio fischeri*, frente a exposição controlada a concentrações pré-estabelecidas, além de avaliar a degradação química do entecavir pelo processo oxidativo avançado de Fenton-like e microbiológica pela ação de cianobactérias.

3.1 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração efetiva média (CE₅₀), concentração inibitória média (CI₅₀) e concentração letal média (CL₅₀) do entecavir para os modelos biológicos propostos;
2. Avaliar alterações no comportamento do *B. glabrata* adulto após a exposição ao entecavir;
3. Avaliar o potencial de biodegradação do entecavir pela cianobactéria *M. novacekii*;
4. Avaliar o uso do reagente de Fenton-like para a degradação do entecavir;
5. Sintetizar as evidências de estudos primários referente a getoxicidade de xenobióticos em *Artemia*.

4 REFERÊNCIAS

- ABAZA, B. E. et al. CHARACTERIZATION OF THE HEMOCYTES OF SUSCEPTIBLE AND RESISTANT BIOMPHALARIA ALEXANDRINA SNAIL. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 671–682, dez. 2016.
- ABBAS, M. et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1295–1309, 2018.
- ABNT. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 27, 2016.
- ABNT. NBR 15411-3: Ecotoxicologia aquática - Inibitório effect on *Vibrio fischeri* bioluminescence. Part 3: Method using freeze-dried bacterias. **Brazilian Association of Technical Standards**, p. 1–27, 2021a.
- ABNT. NBR 16530: Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test method with *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda). **Brazilian Association of Technical Standards**, p. 1–24, 2021b.
- ABNT. **Entidade responsável pela elaboração das Normas Brasileiras (ABNT NBR), elaboradas por seus Comitês Brasileiros (ABNT/CB), Organismos de Normalização Setorial (ABNT/ONS) e Comissões de Estudo Especiais (ABNT/CEE)**. Disponível em: <<https://www.abnt.org.br/>>. Acesso em: 1 jun. 2022.
- ADEMA, C. M. et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. **Nature Communications**, v. 8, n. May, 2017.
- AKKARI, A. C. S. et al. Pharmaceutical innovation: differences between Europe, USA and ‘pharmerging’ countries. **Gestao e Producao**, v. 23, n. 2, p. 365–380, 2016.
- ALLAN, E. R. O.; BLOUIN, M. S. The behavioral effects of antibiotic treatment on the snail *Biomphalaria glabrata*. **PEERJ**, v. 5, 2017.
- AM, I. et al. Hematological, physiological and genotoxicological effects of Match 5% EC insecticide on *Biomphalaria alexandrina* snails. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 1017–1022, 2018.
- ANVISA. ENTECAVIR PARA O TRATAMENTO DA HEPATITE B CRÔNICA. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, v. 1, p. 1–6, 2006.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.
- ASRN. **Artêmia Salina do RN**. Disponível em: <<https://artemiasalinadorn.com.br/sobre-artemia.php>>. Acesso em: 7 out. 2022.
- BAYNES, A. et al. Early embryonic exposure of freshwater gastropods to pharmaceutical 5-alpha-reductase inhibitors results in a surprising open-coiled “banana-shaped” shell. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- BELDEN, J. Introduction to ecotoxicology. In: **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. [s.l.] INC, 2020. p. 381–393.
- BERGAMI, E. et al. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 123, n. 2015, p. 18–25, jan. 2016.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–

530, 2003.

BRASIL. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica : diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2008.

BRASIL. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii - Diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância Epidemiológica, 2014.

BRASIL. **Educação em Saúde para o controle da esquistossomose**. Brasília-DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis., 2018.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais|2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde**, 2022a.

BRASIL. **Painel informativo sobre os tratamentos das hepatites B, C e D no SUS**. Disponível em: <<http://antigo.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hv/monitoramento>>. Acesso em: 27 set. 2022b.

BRASIL. Diagnóstico Temático Serviços de Água e Esgoto - Visão Geral Ano de Referência 2022. **Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental -SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento - SNIS**, p. 1–108, 2023.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. **Advanced Oxidation Processes: Applications, Trends and Prospects**. London: Intechopen Limited, 2020. v. 17

CAIXETA, M. B. et al. Biomphalaria embryotoxicity test (BET): 60 years of research crossing boundaries for developing standard protocols. **Science of the Total Environment**, v. 833, n. April, 2022.

CAMPANA, O.; WLODKOWIC, D. Ecotoxicology Goes on a Chip: Embracing Miniaturized Bioanalysis in Aquatic Risk Assessment. **Environmental science & technology**, v. 52, n. 3, p. 932–946, 2018.

CAMPOS, M. M. C. et al. Evaluation of the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* to remove atrazine from a culture medium Evaluation of the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* to remove atrazine from a culture medium. **Journal of Environmental Science and Health , Part B**, v. 48, n. 2, p. 101–107, 2013.

CAO, H. et al. Development and applications of diffusive gradients in thin films for monitoring pharmaceuticals in surface waters. **Environmental Pollution**, v. 311, n. June, p. 119979, 2022.

CASTILLO, M. G. et al. Biomphalaria glabrata immunity: Post-genome advances. **Developmental and comparative immunology**, v. 104, p. 103557, mar. 2020.

CONAMA. Resolução 357/2005. **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.**, n. 53, p. 58–63, 2005.

CONAMA. Resolução 430/2011. **Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.**, n. 92, p. 89, 2011.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

- CRISTINA, E.; ROLLEMBERG, C. E. Divulgação. v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.
- DE SIQUEIRA, W. N. et al. Study of genotoxic and cytotoxic effects after acute and chronic exposures to industrial sewage sludge on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **CHEMOSPHERE**, v. 249, 2020.
- DE SIQUEIRA, W. N. et al. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**, v. 28, n. 48, p. 69343–69353, 2021a.
- DE SIQUEIRA, W. N. et al. Toxicity and genotoxicity of domestic sewage sludge in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 48, p. 69343–69353, 2021b.
- DOUGLAS, J. S.; SULLIVAN, J. T. Effects of ammonium chloride on microbicidal activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 16, n. 4, p. 339–343, 1992.
- DUTRA, L. V; SCHOLTE, R. G. C. Parte II - Hospedeiros intermediários 11 -. In: **Schistosoma mansoni E ESQUISTOSSOMOSE: UMA VISÃO MULTIDISCIPLINAR**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. p. 393–418.
- EMA. **Baraclude**. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/baraclude#product-information-section>>. Acesso em: 5 out. 2022.
- ESCHER, M. A. DA S. et al. a Problemática Ambiental Da Contaminação Dos Recursos Hídricos Por Fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 51, p. 141–148, 2019.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3 ed. ed. [s.l.] Editora Interciência, 2011.
- FDA. **Drug Approval Package**. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/21797_21798_BaracludeTOC.cfm>. Acesso em: 5 out. 2022.
- FENTON, H. . J. H. LXXIII. - Oxidation os tartaric acid in presence os iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, p. 899–910, 1894.
- FERREIRA, F. A. G. **Toxicidade e remoção de arsênio pela cianobactéria *Microcystis novacekii***. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- FIOCRUZ. **Genoma de caramujo transmissor do *Schistosoma mansoni* é sequenciado**No Title. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/genoma-de-caramujo-transmissor-do-schistosoma-mansoni-e-sequenciado>>. Acesso em: 30 set. 2022.
- FIORANTE, I. A. **Biodegradação/bioacumulação de fármacos pela cianobactéria *Microcystis novacekii* coletada no Parque Estadual do Rio Doce-MG**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- FIORAVANTE, I. A. et al. Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 6, p. 1302–1306, 2010.
- FIORAVANTE, I. A. et al. cyanobacteria *Microcystis novacekii*. **Journal os Environmental Monitiring**, v. 14, p. 2362–2366, 2012.
- FOLEY, C. J. et al. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 550–559, 2018.
- FREITAS, T. et al. Análise Qualitativa e Toxicológica de uma Floração de Cianobactérias na

- Lagoa do Gambá em Ouro Preto, MG, e uma Síntese da Ocorrência de Florações de Cianobactérias no Brasil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 17–28, 2012.
- GATIDOU, G.; STASINAKIS, A. S.; IATROU, E. I. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. **Chemosphere**, v. 119, p. S69–S74, 2015.
- GAUR, N.; NARASIMHULU, K.; PYDISETTY, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 1602–1631, 2018.
- GAZOLA, L. **Análise das legislações estaduais brasileiras sob ensaios ecotoxicológicos como ferramenta no controle de lançamento de efluentes industriais**. [s.l.] Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.
- 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.
- GRABARCZYK, Ł. et al. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 21, p. 26103–26114, 2020.
- GUIRY, M. D. **AlgaeBase. World-wide electronic publication**. Disponível em: <https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=30053>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- HABER, F. et al. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. **The Royal Society**, v. 147, n. 861, p. 332–351, 1934.
- HARKE, M. J. et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4–20, 2016.
- HAYNES, W. M. **Handbook of Chemistry and Physics**. 95. ed. Boca Raton - FL: Taylor & Francis Group, 2014.
- HELAL, E. G. et al. Analysis of Circulating Hemocytes from *Biomphalaria Alexandrina* Following *Schistosoma Mansoni* Infection Using Flow Cytometry. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 54, n. 1, p. 41–53, 2014.
- HUANG, C. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Management**, v. 13, n. 5–7, p. 361–377, 1993.
- HUND-RINKE, K.; SIMON, M. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, n. 4, p. 225–232, 2006.
- IBELINGS, B. W. et al. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 4, p. 487–500, 2005.
- ISHAQUE, A. B. et al. Assessment of individual and combined toxicities of four non-essential metals (As, Cd, Hg and Pb) in the microtox assay. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 3, n. 1, p. 118–120, 2006.
- JACKSON, B. P. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.
- JAIN, S. et al. Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. **Water**,

Air, and Soil Pollution, v. 224, n. 2, p. 1410, 2013.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES EM PEIXES COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR MERCÚRIO (Hg). **Oecologia Australis**, v. 12, n. 04, p. 680–693, 2008.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008.

JIN, L.; ZHANG, G.; ZHENG, X. ScienceDirect Effects of different sludge disintegration methods on sludge moisture distribution and dewatering performance. **JES**, v. 28, p. 22–28, 2014.

KAR, S. et al. Ecotoxicological assessment of pharmaceuticals and personal care products using predictive toxicology approaches. **Green Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1458–1516, 2020.

KAZIMIEROWICZ, J.; DĘBOWSKI, M.; ZIELIŃSKI, M. Effect of Pharmaceutical Sludge Pre-Treatment with Fenton/Fenton-like Reagents on Toxicity and Anaerobic Digestion Efficiency. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 1, 2023.

KOKKALI, V.; KATRAMADOS, I.; NEWMAN, J. D. Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* Nauplii. **Biosensors**, v. 1, n. 2, p. 36–45, 2011.

KORNIS, G. E. M.; BRAGA, M. H.; DE PAULA, P. A. B. Recent transformations in the pharmaceutical industry: an examination of the global and Brazilian experience in the 21st century. **Physis**, v. 24, n. 3, p. 885–908, 2014.

KUMAR, M. et al. A chronicle of SARS-CoV-2: Seasonality, environmental fate, transport, inactivation, and antiviral drug resistance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, n. 336, 2021.

KWAN, W. P.; VOELKER, B. M. Decomposition of Hydrogen Peroxide and Organic Compounds in the Presence of Dissolved Iron and Ferrihydrite. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 1467–1476, 2002.

LAURETI, L.; MATIC, I.; GUTIERREZ, A. Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 2, n. 1, p. 100–114, mar. 2013.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: FAO, 1996.

LIBRALATO, G. et al. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 35–49, 2016.

LIMA, M. DE VASCONCELOS et al. Cytotoxic and genotoxic effect of oxyfluorfen on hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Environmental science and pollution research international**, v. 26, n. 4, p. 3350–3356, fev. 2019.

LIN, S. H.; LO, C. C. Fenton process for treatment of desizing wastewater. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2050–2056, 1997.

LKCNH, (LEE KONG CHIAN NATURAL HISTORY MUSEUM). **The biodiversity of Singapore**. Disponível em: <<https://singapore.biodiversity.online/species/B-Alga-Cyanobacteria-000004>>. Acesso em: 30 set. 2022.

LO NOSTRO, P. et al. Specific anion effects in *Artemia salina*. **Chemosphere**, v. 135, p. 335–340, set. 2015.

MA, J. et al. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to

- carbamate insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, n. 2, p. 268–274, 2006.
- MADIGAN, M. T. et al. Brock Biology of Microorganisms. In: 13th. ed. San Francisco: Benjamin Cumings, 2010. p. 1155.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A. Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A.; MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. A Ecotoxicologia como ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008.
- MARCELINO, R. B. P. et al. Tendências E Desafios Efluentes Industriais Não Biodegradáveis : **Revista UFMG, Belo Horizonte**, v. 20, n. 2, p. 358–383, 2013.
- MARKERT, B. et al. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 240, n. 2, p. 425–429, 1999.
- MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 13, n. 7, p. 1866–1875, jul. 2011.
- MELO, A. S. et al. Degradação de Fármacos Residuais por Processos Oxidativos Avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.
- MERZ, J. H.; WATERS, W. A. The oxidation of aromatic compounds by means of the free hydroxyl radical. **Journal of Chemical Society**, p. 2427–2433, 1949.
- MESSELE, S. A. et al. Enhanced degradation of phenol by a fenton-like system (Fe/EDTA/h₂ o₂) at circumneutral pH. **Catalysts**, v. 9, n. 5, 2019.
- MOHAMMED, A. Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults? In: GOWDER, S. (Ed.). . **New Insights into Toxicity and Drug Testing**. Rijeka: IntechOpen, 2013. p. 254.
- MONSALVO, V. M. et al. Application of Fenton-like oxidation as pre-treatment for carbamazepine biodegradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 856–862, 2015.
- MUSTAFA, S. et al. Journal of Water Process Engineering Microalgae biosorption , bioaccumulation and biodegradation efficiency for the remediation of wastewater and carbon dioxide mitigation : Prospects , challenges and opportunities. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, n. March, p. 102009, 2021.
- NANNOU, C. et al. 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.
- NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 135398508, Entecavir**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>>. Acesso em: 27 set. 2022.
- NCUBE, S. et al. **Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives** *Water Research* Elsevier Ltd, , 2018.
- NEMATI, T.; SARKHEIL, M.; JOHARI, S. A. Trophic transfer of CuO nanoparticles from brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii to convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*) larvae: uptake, accumulation and elimination. **Environmental science and pollution research international**, v. 26, n. 10, p. 9610–9618, abr. 2019.

- NICHOLLS, R. D. Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes: A review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 1, p. 16–25, 1993.
- NIRMALAKHANDAN, N. et al. Algal wastewater treatment: Photoautotrophic vs. mixotrophic processes. **Algal Research**, v. 41, n. June, p. 101569, 2019.
- NORSWORTHY, A. N.; VISICK, K. L. Gimme shelter: how *Vibrio fischeri* successfully navigates an animal's multiple environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. November, p. 1–14, 2013.
- NSF. **National Science Foundation**. Disponível em: <https://www.nsf.gov/news/mmg/mmg_disp.jsp?med_id=51885>. Acesso em: 4 jul. 2023.
- NTUNGWE, N. E. et al. Artemia species : **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 2020.
- NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.
- OECD. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 2**, n. April, p. 1–12, 2004.
- OECD. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Tests. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 2**, n. July, p. 4–7, 2006.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. Effects of γ -Fe₂O₃ nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 18, p. 18362–18368, set. 2016.
- PARSONS, S. **Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment**. London: IWA Publishing, 2005.
- PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 265–268, 2006.
- PFLUGMACHER, S.; SCHRODER, P.; SANDERMANN, H. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 267–273, 2000.
- PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 1–84, 2006.
- POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; LÓPEZ-DOVAL, J. C. **Aspectos da ecotoxicidade em ambientes aquáticos**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2022.
- RANGA, A. et al. Advancing beyond reverse transcriptase inhibitors: The new era of hepatitis B polymerase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 257, n. February, p. 115455, 2023.
- RASHED, M. N. ET AL. **Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Rijeka: IntechOpen, 2022.
- REICHEL-TBRUSHETT, A. Risk Assessment and Ecotoxicology. **Oceanography**, v. 25, n. 4, p. 40–51, 30 set. 2012.
- RIBEIRO, I. A. T. A. et al. Toxic effect of *Croton rudolphianus* leaf essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae and *Artemia salina*. **ACTA**

TROPICA, v. 223, 2021.

RIBEIRO, M. V.; FERREIRA, L. T. B.; TIAGO, P. M. N. **BioDiversity4All**. Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/taxa/208360-Microcystis>>. Acesso em: 11 jul. 2023.

RIVKIN, A. A review of entecavir in the treatment of chronic hepatitis B infection. **Current Medical Research and Opinion**, v. 21, n. 11, p. 1845–1856, 2005.

RODRIGUEZ, M. et al. Photo-Fenton treatment of a biorecalcitrant wastewater generated in textile activities : biodegradability of the photo-treated solution. v. 151, p. 129–135, 2002.

SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, n. 8, p. 1417–1430, 1 dez. 2006.

SARRIA, V. et al. An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. v. 159, p. 89–99, 2003.

SHAW, T.; LOCARNINI, S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, n. 6, p. 853–871, 2004.

SILVA, D. C. V. R. DA; POMPÊO, M.; PAIVA, T. C. B. DE. A ecotoxicologia no Contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**, p. 340–353, 2015.

SILVA, S. et al. Biodegradation of the antiviral tenofovir disoproxil by a cyanobacteria / bacteria culture . **Research Square**, p. 1–18, 2022.

SILVA, S. R. et al. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10, n. 12, p. 1565–1577, 2019.

SIMS, K. A.; WOODLAND, A. M. Entecavir: A new nucleoside analog for the treatment of chronic hepatitis B infection. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 12 I, p. 1745–1757, 2006.

SINGH, A. K. et al. Trends in predictive biodegradation for sustainable mitigation of environmental pollutants: Recent progress and future outlook. **Science of the Total Environment**, v. 770, 2021.

SOUZA-SILVA, G. et al. Toxicological evaluation of antiretroviral Tenofovir Disoproxil Fumarate on the mollusk *Biomphalaria glabrata* and its hemocytes. **Science of the Total Environment**, v. 891, n. March, 2023a.

SOUZA-SILVA, G. et al. Using freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) as a biological model for ecotoxicology studies: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 11, p. 28506–28524, 2023b.

SOUZA, C. R. et al. Environmental elimination estimate and literature review of ecotoxicological aspects of the main widely used antiretrovirals in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e368111032975, 2022.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. **Environment International**, v. 51, p. 59–72, 2013.

SULLIVAN, J. T.; CASTRO, L. Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine. **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 1, p. 32–38, set. 2005.

SUN, Y.; PIGNATELLO, J. J. Chemical Treatment of Pesticide Wastes. Evaluation of Iron(III) Chelates for Catalytic Hydrogen Peroxide Oxidation of 2,4-D at Circumneutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 322–327, 1992.

TALLARICO, L. et al. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria*

- glabrata (SAY, 1818). **Mutation research**, v. 561, n. 1–2, p. 139–145, jul. 2004.
- TALLARICO, L. DE F. et al. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208–215, 2014.
- TANG, Y. et al. Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. **Water Environment Research**, v. 91, n. 10, p. 984–991, 2019.
- THOMAS, J. D.; NWANKO, D. I.; STERRY, P. R. The Feeding Strategies of Juvenile and Adult *Biomphalaria glabrata* (Say) under Simulated Natural Conditions and their Relevance to Ecological Theory and Snail Control. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 226, n. 1243, p. 177–209, 1985.
- TORRES, M. A. et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 1–15, 2008.
- TOULIABAH, H. E. S. et al. A Review of Microalgae-and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. **Molecules**, v. 27, n. 3, 2022.
- UMMALYMA, S. B.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Bioremediation by Microalgae : Current and Emerging Trends for Effluents Treatments for Value Addition of Waste Streams. In: **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**. Singapore: Springer, 2017. p. 355–375.
- VENTURA, S. P. M. et al. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* marine bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, n. 1, p. 48–54, 2014.
- VERMA, S. C.; MIYASHIRO, T. Quorum sensing in the squid-*Vibrio* symbiosis. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 16386–16401, 2013.
- VILLET, S. et al. Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 531–538, 2007.
- VS, G. et al. Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Mutation research**, v. 654, n. 1, p. 58–63, 2008.
- WANG, X. H. et al. Comparison of toxicities to *Vibrio fischeri* and fish based on discrimination of excess toxicity from baseline level. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–17, 2016.
- WANG, Y. et al. Uptake, Elimination and Effects of Cosmetic Microbeads on the Freshwater Gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Toxics**, v. 10, n. 2, 2022.
- WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Klumer Academic Publishers, 2002.
- WHO. **GUIDELINES FOR THE PREVENTION, CARE AND TREATMENT OF PERSONS WITH CHRONIC HEPATITIS B INFECTION**. Geneva: Global Hepatitis Programme. Department of HIV/AIDS, 2015.
- WHO. **Global hepatitis report, 2017**. Geneva: WHO, Global Hepatitis Programme, Department of HIV/AIDS, 2017.
- WILKINSON, J. L. et al. Pharmaceutical pollution of the world ' s rivers. **Environmental Sciences**, v. 119, n. 8, p. 1–10, 2022.
- WLODKOWIC, D.; KARPIŃSKI, T. M. Live-cell systems in real-time biomonitoring of water pollution: Practical considerations and future perspectives. **Sensors**, v. 21, n. 21, 2021.
- XIAO, M.; LI, M.; REYNOLDS, C. S. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. **Biological Reviews**, v. 93, n. September, p. 1399–1420, 2018.

YAMANAKA, G. et al. Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 190–193, 1999.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Primeira ed. São Carlos: [s.n.].

ZENKER, A. et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p. 378–387, 2014.

ZHU, S. et al. Developmental toxicity of Fe(3)O(4) nanoparticles on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 230, p. 683–691, nov. 2017.

5 CAPÍTULO 1 – ESTIMATIVA DE ELIMINAÇÃO NO MEIO AMBIENTE E REVISÃO DE LITERATURA DE ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DOS PRINCIPAIS ANTIRRETROVIRAIS MAIS UTILIZADOS NO BRASIL

Environmental elimination estimate and literature review of ecotoxicological aspects of the main widely used antiretrovirals in Brazil

Estimación de la eliminación en el medio ambiente y revisión de la literatura sobre aspectos ecotoxicológicos de los principales fármacos antirretrovirales más utilizados en Brasil

Cléssius Ribeiro de Souza^{1*}, Matheus de Freitas Ribeiro¹, Míriam de Fátima Soares², Simone Furtado Santos¹, Cíntia Aparecida de Jesus Pereira³, Marcos Paulo Gomes Mol⁴, Micheline Rosa Silveira¹

1 – Departamento de Farmácia Social, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil;

6 – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Brasil

7 – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

4 – Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brasil;

*Autor correspondente: ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0884-1202> - E-mail: clessiusdcq@gmail.com

Research, Society and Development, v. 11, n. 10, e368111032975, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32975>

Received: 07/14/2022 | Reviewed: 07/24/2022 | Accept: 07/26/2022 | Published: 08/04/2022

Resumo

Objetivo: Estimar o consumo e a quantidade de antirretrovirais (ARV) eliminados inalterados no meio ambiente e realizar uma pesquisa bibliográfica sobre estudos de ecotoxicologia aquática de ARV utilizados no Brasil. **Metodologia:** Foi solicitado em uma das unidades dispensadoras de ARV da cidade de Belo Horizonte (BH) a quantidade de ARV dispensada nos anos de 2018-2019-2020. Considerando a quantidade dispensada em 2020, a dose diária e a taxa de eliminação, foram estimadas as quantidades de fármaco na forma inalterada no ambiente. Para todo o município de BH e Brasil, foram utilizados dados epidemiológicos referentes aos indivíduos em uso de terapia antirretroviral (TARV) em 2020, a proporção de pessoas vivendo com HIV em uso do regime principal de TARV, seguindo a mesma metodologia de estimativa utilizada anteriormente. Foram realizadas buscas estruturadas e individuais para cada ARV utilizado no Brasil, relacionando-o à ecotoxicologia, por meio do Google Scholar, National Center for Biotechnology Information e Scifinder, além do uso da plataforma fass.se. **Resultados:** Quatro artigos apresentaram resultados de toxicidade aguda ou crônica em modelos ecotoxicológicos envolvendo ARV. Dolutegravir e efavirenz foram considerados altamente tóxicos. Em 2020, aproximadamente 2.167 kg de ARV na forma inalterada foram liberados no meio ambiente em BH. No Brasil foram 112.274 kg. **Conclusão:** É urgente quantificar os principais ARV em corpos d'água. Com esses dados, somados aos dados ecotoxicológicos será possível estabelecer critérios de risco para possíveis medidas de controle ou mitigação desses contaminantes no meio ambiente, especialmente ações de melhoria nos tratamentos de esgoto/águas.

Palavras-chave: Antirretrovirais; Ecotoxicologia; Meio Ambiente.

1. Introdução

Com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico, houve um aumento exponencial no número de novos fármacos e nas quantidades produzidas em todo o mundo (AKKARI et al., 2016; KORNIS; BRAGA; DE PAULA, 2014). Os benefícios do desenvolvimento dos medicamentos, produtos para a saúde, detergentes, desinfetantes, surfactantes, pesticidas e outros compostos orgânicos são evidenciados pela melhoria da qualidade de vida dos seres humanos, animais domésticos e animais destinados à atividade agrícola, no entanto, o ciclo de produção e consumo geram novos tipos de resíduos considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) (TANG et al., 2019).

Os POPs são compostos orgânicos resistentes à degradação ambiental por meio de processos biológicos, químicos e fotolíticos gerando toxicidade (RASHED, 2022). Como exemplo, os resíduos de processos produtivos da indústria química e farmacêutica, medicamentos descartados de forma inadequada e os seus metabólitos associados ao consumo (JAIN et al., 2013; NCUBE et al., 2018; RASHED, 2022). Devido à sua persistência, os POPs podem se bioacumular e afetar negativamente a saúde humana e o meio ambiente (RASHED, 2022).

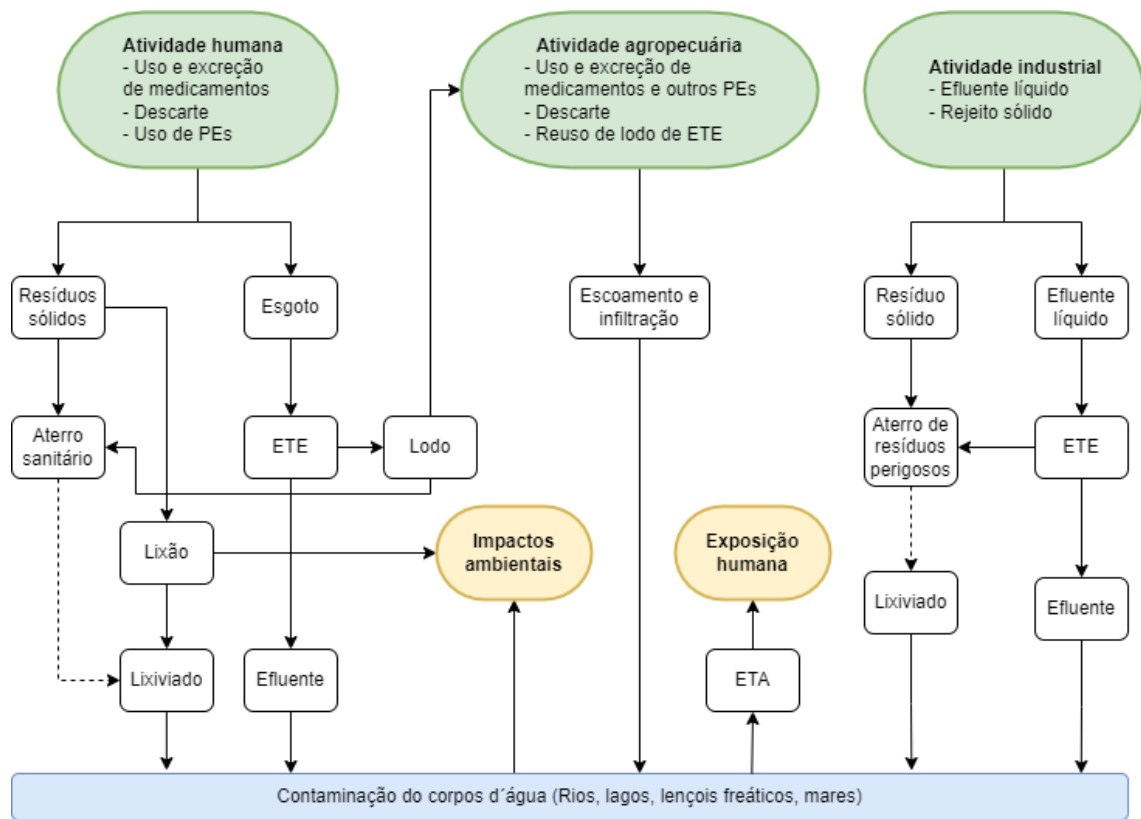
No que se refere aos fármacos antivirais (ANV) e antirretrovirais (ARV), destaca-se os medicamentos utilizados para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente existem no mundo 37,6 milhões de pessoas vivendo com o vírus e dessas, 27,4 milhões estão em terapia antirretroviral (TARV), no Brasil são aproximadamente 920 mil pessoas com o vírus e destas 665 mil em TARV (BRASIL, 2020; UNAIDS, 2021). A utilização da TARV é fundamental para as pessoas que vivem com HIV, entretanto, o resíduo gerado não deve ser desconsiderado, visto que ele pode estar associado a processos de geração de cepas virais resistentes aos fármacos, além disso, podem desequilibrar o ecossistema gerando novos problemas (KUMAR et al., 2021; NANNOU et al., 2020). Diversos estudos apontaram a presença de ARV em água potável e em água bruta, como as provenientes de rios, lagos, lagoas e águas subterrâneas (JAIN et al., 2013; NANNOU et al., 2020; PRASSE et al., 2010). Em uma recente revisão da literatura realizada por Nannou et al. (2020) foi apresentado em diversos estudos a presença de ANV e ARV no meio ambiente, e a maior parte deles concentra-se na Europa e África do Sul, sendo 22 e 13 estudos respectivamente, a América Central e América do Sul não apresentaram nenhum estudo relevante selecionado pelos autores (NANNOU et al., 2020).

A estimativa de efeitos aos ecossistemas por parte dos poluentes é realizada principalmente por meio de ensaios ecotoxicológicos, utilizando organismos presentes na atmosfera, litosfera e principalmente organismos presentes na hidrosfera (COSTA et al., 2008; GAZOLA, 2020). A maioria das plantas para o tratamento dos efluentes contendo os novos poluentes utilizam metodologias de tratamento de esgotos convencionais, adotadas pelas companhias de saneamento, que removem cargas orgânicas por meio de processos biológicos, porém nem sempre efetivo para remoção de substâncias recalcitrantes. Outros processos que envolvem o emprego de tecnologia, como os processos oxidativos avançados, que tem como objetivo degradar substâncias recalcitrantes, podem ser utilizados em substituição ou

associados aos processos convencionais (VON SPERLING, 1996; BRITO, MARINHO SILVA, 2012; FIOREZE et al 2014).

As formas pelas quais os antirretrovirais alcançam o meio ambiente são, descarte de resíduos do processo produtivo pela indústria farmacêutica (efluente industrial), efluente hospitalar, eliminação dos fármacos na forma inalterada ou por meio de metabolitos. Além disso, o processo de descarte inadequado dos medicamentos é uma fonte de contaminação do ambiente (JAIN et al., 2013; NCUBE et al., 2018). Na figura 1 está representado o ciclo dos medicamentos no meio ambiente após a dispensação para o consumo e suas potenciais consequências.

Figura 1. Possíveis rotas de medicamentos e outros poluentes emergentes para o meio ambiente



PEs: Poluentes emergentes; ETE: Estação de tratamento de efluente; ETA: Estação de tratamento de água; Seta tracejada: Falha na contenção

Fonte: Adaptado de AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO (2013)

O impacto desses poluentes no meio ambiente pode ser coibido por meio do tratamento eficaz dos resíduos e efluentes e da gestão adequada da disposição final. No Brasil, a Resolução Nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 13 de maio de 2011, exige o tratamento prévio dos resíduos a serem descartados por indústrias e hospitais (CONAMA, 2011b). Em relação ao esgoto doméstico, embora a universalização do saneamento esteja prevista na Constituição e garantida pela Lei 11.445/2001, na prática, observa-se a falta de universalização da coleta e do tratamento de esgoto. De acordo com o Instituto Trata Brasil, apenas 54,1% da população brasileira tem acesso à coleta adequada de esgoto, e 49,1% do esgoto produzido tem tratamento adequado (INSTITUTO TRATA BRASIL, 2021). Embora existam algumas metodologias para mitigar a carga de resíduos lançados no meio ambiente, é necessária uma avaliação de sua eficiência e dos possíveis efeitos sobre a vida aquática (CONAMA, 2011b; GAZOLA, 2020).

1.1 Legislação e normas brasileiras para a ecotoxicologia

O termo ecotoxicologia foi proposto durante uma reunião, em Estocolmo, no Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em junho de 1969 pelo pesquisador francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977 apud MAGALHÃES e FILHO, 2008). Segundo Truhaut (1977), a ecotoxicologia é um ramo da toxicologia, que busca estudar os efeitos tóxicos de poluentes, naturais ou sintéticos, sobre a vida de forma geral, seja ela microbiológica, vegetal ou animal. Ela é uma ferramenta para avaliar o impacto dos poluentes ao meio ambiente, além de prever os possíveis danos futuros, considerando assim as diversas possibilidades de interação (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos são utilizados tradicionalmente para avaliar o efeito de determinadas substâncias ou um conjunto das mesmas e também de águas contaminadas. Os testes realizados com substâncias específicas são utilizados com o intuito de obter registros químicos, os testes com águas são utilizados para obtenção de informações a respeito da conformidade do corpo hídrico ou de um efluente industrial. Os dados a respeito da toxicidade são uteis para a avaliação e comparação da suscetibilidade do organismo aquático à diferentes substâncias (COSTA et al., 2008).

Diversos órgãos de proteção ambiental trabalham para o desenvolvimento e padronização desses testes com a finalidade de organizar estratégias de proteção ambiental. Dentre as organizações internacionais empenhadas nesse trabalho, podem ser citadas a *United*

States Environmental Protection Agency (US EPA), American Society for Testing and Materials (ASTM), Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Association of Analytical Communities (AOAC) e International Organization for Standardization (ISO). No Brasil a organização responsável pelo desenvolvimento e padronização de protocolos de testes toxicológicos é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), além dela, a CETESB também realiza alguns trabalhos de padronização (COSTA et al., 2008).

Para os testes ecotoxicológicos, a indicação é de que os testes sejam realizados em mais de uma espécie da biota aquática, preferencialmente pertencentes a diferentes níveis tróficos, como produtores, consumidores primários e consumidores secundários. Além dos organismos de diferentes níveis tróficos, podem ser utilizados também os decompositores, como bactérias e rotíferos (COSTA et al., 2008). Na legislação brasileira, as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) RE 357/2005 e RE 430/2011 estabelecem a possibilidade de uso de indicadores biológicos, testes de toxicidade para interações de compostos não listados na resolução além da realização de ensaios ecotoxicológicos em efluentes utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes. No quadro 1 é possível ver a lista das principais normas brasileiras para testes ecotoxicológicos aquáticos (ABNT, 2022; CONAMA, 2005, 2011).

Quadro 1. Testes ecotoxicológicos padronizados no Brasil

Efeito	Organismo	Espécie	Nível trófico	Normas em vigor
Crônico	Peixe	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Consumidor secundário	ABNT NBR 15499:2022
Agudo	Peixe	<i>Danio rerio</i> , <i>Pimephales promelas</i>	Consumidor secundário	ABNT NBR 15088:2022
Agudo	Crustáceo	<i>Daphnia similis</i> , <i>Daphnia magna</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 12713:2022
Agudo	Crustáceo	Anfípodos	Consumidor primário	ABNT NBR 16638:2021
Agudo	Crustáceo	<i>Artemia sp</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 16530:2021
Crônico	Alga	Microalgas marinhas		ABNT NBR 16181:2021
Agudo	Crustáceo	Copépodos marinhos	Consumidor primário	ABNT NBR 16723:2021
Agudo	Bactéria	<i>Aliivibrio fischeri</i>	Decompositor	ABNT NBR 15411:2021
Crônico	Crustáceo	<i>Hyaella spp</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 15470:2021
Crônico	Equinodermo	<i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .	Consumidor primário	ABNT NBR 15350:2020
Crônico	Alga	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Produtor	ABNT NBR 12648:2018
Agudo	Crustáceo	Misídeos	Consumidor primário	ABNT NBR 15308:2017
Crônico	Crustáceo	<i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 13373:2016

Agudo	Molusco bivalve	<i>Perna perna</i>	Consumidor primário	ABNT NBR 16456:2016
Agudo	Crustáceo	Anfípodos marinhos	Consumidor primário	ABNT NBR 15638:2015

Fonte: Próprios autores (2022).

Nos testes de toxicidade busca-se compreender os efeitos tóxicos de substâncias aos organismos. Esses testes podem avaliar a toxicidade aguda e a crônica. No ensaio de toxicidade aguda avalia-se os efeitos da(s) substância(s) sobre os organismos em um curto espaço de tempo, pois esses efeitos são resultados de um contato único ou múltiplos contatos em um prazo de 24h a 96h. Os parâmetros avaliados, geralmente são a mortalidade ou imobilidade, bem como as alterações metabólicas ou em reações bioquímicas. Os resultados desses testes podem ser expressos como CL₅₀ (concentração letal média), CE₅₀ (concentração efetiva média), CI₅₀ (concentração inibitória média) e DL₅₀ (dose letal média), isto é, a concentração da substância que causa a morte, imobilidade ou a inibição de crescimento a 50% dos organismos-teste depois de um tempo específico de exposição (COSTA et al., 2008; GAZOLA, 2020).

Os testes de toxicidade crônica avaliam os efeitos da exposição em longo prazo às substâncias estudadas, compreendendo todo o seu ciclo de vida ou parte dele. Eles são usados para a avaliação de doses subletais, como por exemplo, para a avaliação de um efluente tratado, visto que a exposição dos organismos a baixas concentrações não elimina o risco de efeitos deletérios (COSTA et al., 2008). O principal objetivo é compreender quais são os efeitos sobre o ciclo da vida dos organismos, como por exemplo, se há distúrbios nas funções biológicas (reprodução, desenvolvimento de ovos e maturação). Além disso, são úteis para o estudo da capacidade de bioacumulação dos poluentes e do potencial carcinogênico e mutagênico (ZENKER et al., 2014). Diante disso, a avaliação da toxicidade crônica é importante para complementar o teste de toxicidade aguda, a fim obter informações adequadas a respeito dos agentes estudados. Os testes de toxicidade crônica são realizados períodos de sete a 21 dias. Os resultados geralmente são expressos como CENO (concentração de efeito não observado), maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste, e CEO (concentração de efeito observado), menor concentração de agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste, porém os resultados podem ser expressos como CE₅₀ (COSTA et al., 2008; GAZOLA, 2020).

O objetivo com esse estudo foi estimar o consumo e quantidade eliminada na forma inalterada de ARV para o meio ambiente em Belo Horizonte e no Brasil e realizar uma pesquisa

na literatura científica para obter uma visão geral e mais atualizada dos estudos ecotoxicológico no ambiente aquático envolvendo os ARV utilizados no Brasil.

2. Metodologia

2.1. Estimativa de consumo e eliminação dos antirretrovirais no Brasil

Em virtude da dificuldade de se estabelecer com precisão o quantitativo de ARV consumido, uma das formas de estimar o consumo dos medicamentos é por meio das informações diretas de dispensação dos centros de distribuição dos ARV. Foi solicitada a uma das unidades dispensadora de ARV do município de Belo Horizonte, a qual realiza o atendimento clínico e ambulatorial a PVHIV e acometidas por outras doenças infecto contagiosas, a quantidade dispensada de ARV nos anos de 2018, 2019 e 2020. Com base na quantidade dispensada no último ano, na dose diária recomendada de cada fármaco e a taxa de eliminação, foi estimado a quantidade de fármaco no meio ambiente para o município estudado. Os resultados atualizados foram obtidos por meio da multiplicação entre a dose diária recomendada, porcentagem eliminada na forma inalterada, estimativa da quantidade de unidades farmacotécnicas dispensadas por ano seguida pela divisão por um milhão para expressar os valores em quilogramas.

Para os dados gerais relacionados ao município de Belo Horizonte e do Brasil, a quantidade de ARV específicos consumidos não estava disponível, o que dificultou estimar a quantidade liberada desses fármacos no meio ambiente. Para se obter uma estimativa do quantitativo de antirretroviral dispensado no meio ambiente, foram utilizados os dados epidemiológicos referentes ao número de indivíduos em uso de TARV em 2020 em Belo Horizonte e no Brasil, aplicando a mesma equação matemática para a quantificação dos ARV na unidade de dispensação de ARV de Belo Horizonte.

2.2 Estudos de ecotoxicidade

A revisão integrativa foi utilizada como método da pesquisa, que consiste em construir uma análise ampla da literatura, contribuindo para discussões sobre métodos e resultados de pesquisa, bem como reflexões sobre a realização de novos estudos (CRONIN; GEORGE, 2020; WHITTEMORE; KNAFL, 2005).

Para a realização da busca bibliográfica, foram selecionados todos os ARV mais utilizados no Brasil e incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME 2020) (BRASIL, 2019). Após a definição de quais ARVs seriam avaliados, realizou-se a busca de cada medicamento individualmente nas plataformas *Google Scholar*, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *SciFinder*. No *Google Scholar*, foram utilizados os seguintes descritores para a estratégia de busca: (nome do antirretroviral) AND *ecotoxicology* OR *ecotoxicity* OR *ecotoxicological*. No NCBI, utilizámos: ((Nome do antirretroviral) AND (*ecotoxicological*) OR (*ecotoxicity*) OR (*ecotoxicology*)). No *SciFinder*, com cada um dos termos sendo pesquisado individualmente, usamos: (*antiretroviral name*) AND *ecotoxicology*, (*antiretroviral name*) AND *ecotoxicity*, (*antiretroviral name*) AND *ecotoxicological*. Para avaliação foram consideradas publicações em qualquer data até 2021; artigos científicos; textos completos em inglês ou português; artigos que apresentassem resultados para testes de toxicidade de ARVs incluídos na lista RENAME 2020, para alguns organismos-teste, indicando a concentração de toxicidade aguda ou crônica; artigos com informações sobre a concentração inicial e após o tratamento do efluente, de pelo menos um ARV da lista RENAME 2020. Foram excluídos textos incompletos ou em outros idiomas, teses, livros, artigos de revisão de literatura e estudos de estimativa de toxicidade realizados por meio de software, caso o trabalho tenha sido realizado apenas para esse fim. As informações ecotoxicológicas sobre os ARV registrados na Suécia foram também pesquisadas no sítio Web da Fass (2016) e inseridas neste trabalho como motor de pesquisa, uma vez que apresentavam os resultados dos testes de ecotoxicidade de fármacos e medicamentos realizados pelos titulares do registo de medicamentos.

Os resultados de ecotoxicidade foram discutidos a partir de uma perspectiva comparativa e de análise das informações obtidas. Um dos parâmetros utilizados foi a classificação de ecotoxicidade aguda apresentada na Tabela 1, proposta por ZUCKER (1985) (ZUCKER, 1985). Além disso, foram também avaliados os dados de toxicidade crônica.

Tabela 1. Parâmetros de ecotoxicidade aguda

Classificação	Parâmetro	Concentração mg/L
Extremamente tóxico	CL ₅₀ or CE ₅₀	<0,1
Altamente tóxico	CL ₅₀ or CE ₅₀	0,1 – 1
Moderadamente tóxico	CL ₅₀ or CE ₅₀	1 – 10
Ligeiramente tóxico	CL ₅₀ or CE ₅₀	10 – 100
Praticamente não tóxico	CL ₅₀ or CE ₅₀	>100

Fonte: ZUCKER (1985)

3. Resultados e discussão

A compreensão dos aspectos de eliminação de fármacos é fundamental para estimar a percentagem não metabolizada que é eliminada e conhecer os metabolitos mais comuns. As propriedades físico-químicas são parâmetros importantes para prever alguns comportamentos das substâncias no meio ambiente. A Tabela 2 apresenta as estimativas de eliminação de fármacos pelo organismo humano na forma inalterada e seus metabolitos primários.

Tabela 2. Dados da eliminação dos antirretrovirais presentes na Relação 2020 dispensados no Brasil

Fármaco	Dose diária recomendada (mg)*	Eliminação forma inalterada (%)		Metabolitos
		Urina	Fezes	
Abacavir	600	1,2	16	5'-carboxílico (30%); 5'-glicuronídeo (36%); outros metabolitos (15%)
Atazanavir	300	7	20	-
Darunavir	1200	7,7	41,2	-
Didanosina**	-	-	-	-
Dolutegravir	50	<1	53	éter de glicuronídeo (18,9%); metabolito da N desalquilação (3,6%); metabolito formado pela oxidação do carbono bezílico (3,0%)
Efavirenz	600	<1	16-61 ^a	7-hidroxi-efavirenz; 8-hidroxi-efavirenz; 8,14- dihidroxi-efavirenz
Enfuvirtida	180	-	-	Amino ácidos
Emtricitabina	200	73	14	Diastereoisómeros 3'-sulfoxido; 2'-O-glicuronídeo
Etravirina	400	-	81,2-86,4	-
Fosamprenavir	1400	-	1%	-
Lamivudina	300	~70%	-	Sulfoxido de lamivudina, Lamivudina 5' trifosfato
Lopinavir	800	2,2	19,8	12 metabolitos diferentes; Metabolitos de oxidação
Maraviroque	600	8	25	Diversos metabolitos
Nevirapina	400	<3	-	2 -hidroxinevirapina glucuronídeo 3- hidroxinevirapina glucuronídeo 8-hidroxinevirapina glucuronídeo 12-hidroxinevirapina glucuronídeo 4-carboxynevirapine
Raltegravir	400	9	-	raltegravir-glucoronídeo
Ritonavir	400	3,5	33,8	isopropiltiazolil metabolito de oxidação
Saquinavir**	-	-	-	-
Tenofovir	300	70-80	-	Tenofovir alafenamida

Tipranavir	1000	-	52	metabolito hidroxilado e glucoronídeo
Zidovudina	600	29	-	3'-azido-3'-deoxy-5'- O-beta-Dglucopiranosilimidina, produtos de ciclo adição isoméricos

* Doses indicadas para adultos. Em casos em que as doses são variáveis, foram utilizadas as maiores doses recomendadas. **Medicamentos desincorporados da RENAME 2020

De acordo com dados de uma das unidades de dispensação de ARV em Belo Horizonte (MG), Tabela 3, observamos um aumento de cerca de 20% na quantidade total de ARV dispensados de 2018 para 2020, representando aproximadamente 52 kg de ARV descartados no meio ambiente. Em 2020, somente nesta unidade de dispensação, foram dispensadas mais de 2.400.000 unidades farmacotécnicas de ARV para aproximadamente 3.479 pessoas. Os maiores percentuais no último ano foram de dolutegravir, lamivudina e tenofovir, enfatizando o crescente número de unidades desses medicamentos ao longo do triênio observado, decorrente da diretriz que estabeleceu em 2017 essa combinação como terapia de primeira linha no tratamento da infecção pelo HIV no Brasil. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, 12.833 PVHIV estavam em TARV (Brasil 665.799) em Belo Horizonte em 2020 (BRASIL, 2022c). Assim, com base na proporção de PVHIV em uso do esquema terapêutico de primeira linha alcançado para a unidade de ARV de Belo Horizonte avaliada, na dosagem recomendada de um comprimido de dolutegravir 50 mg + um comprimido de tenofovir 300 mg associado à Lamivudina 300 mg administrados diariamente, a quantidade estimada de ARV dispensada aos indivíduos e eliminada inalterada no meio ambiente em Belo Horizonte e no Brasil foi de aproximadamente 2.175 kg e 112.273 kg, respectivamente, conforme apresentado na tabela 4.

Table 3. Dados sobre dispensação e descarte de antirretrovirais de uma unidade de dispensação de medicamentos em Belo Horizonte (MG), Brasil

Fármaco	Concentração	Forma farmacêutica	Taxa de eliminação na forma inalterada (%)	Número de unidades farmacotécnicas dispensadas			Estimativa anual de eliminação anual (Kg) no meio ambiente		
				2018	2019	2020	2018	2019	2020
Abacavir	300mg	Comprimido	17.2	59,100 (2.9 %)	45,360 (2.1%)	41,880 (1.7%)	3.0	2.3	2.2
Abacavir	20mg/ml	Solução Oral	17.2	4 (0%)	0 (0%)	8 (0%)	0.0	0.0	0.0
Atazanavir	300mg	Cápsula	27	207,300 (10.2 %)	178,230 (8.2%)	168,210 (6.9%)	16.8	14.4	13.6
Darunavir	600mg	Comprimido	48.9	140,160 (6.9%)	143,400 (6.6%)	155,880 (6.4%)	41.1	42.1	45.7
Dolutegravir	50mg	Comprimido	53	194,310 (9.6%)	373,140 (17.2%)	532,380 (21.7%)	5.1	9.9	14.1
Efavirenz	600mg	Comprimido	39	37,650 (1.9%)	29,850 (1.4%)	26,610 (1.1%)	8.8	7.0	6.2
Efavirenz	30mg/ml	Solução Oral	39	7 (0%)	0 (0%)	8 (0%)	0.0	0.0	0.0
Etravirina	200mg	comprimido	83.8	4,620 (0.2%)	5,100 (0.2%)	4,500 (0.2%)	0.8	0.9	0.8
Lamivudine	150mg	Comprimido	70	79,440 (3.9%)	103,080 (4.7%)	134,940 (5.5%)	8.3	10.8	14.2
Lamivudine*	10mg/ml	Solução Oral	70	19,920 (1.0%)	8,880 (0.4%)	20,640 (0.8%)	0.4	0.2	0.4
Lopinavir + Ritonavir*	80+20mg/ml	Solução Oral	15	4,320 (0.2%)	320 (0%)	0 (0%)	0.1	0.0	0.0
Maraviroc	150mg	Comprimido	25	1,320 (0.1%)	1,380 (0.1%)	1,380 (0.1%)	0.0	0.1	0.1
Nevirapine	200mg	Comprimido	1	26,760 (1.3%)	18,060 (0.8%)	16,320 (0.7%)	0.1	0.0	0.0
Raltegravir	400mg	Comprimido	42	3,960 (0.2%)	3,240 (0.1%)	3,420 (0.1%)	0.7	0.5	0.6
Ritonavir	100mg	Comprimido	18.7	328,320 (16.1%)	291,300 (13.4%)	283,650 (11.6%)	6.1	5.4	5.3
Tenofovir	300mg	Comprimido	75	5.280 (0,3%)	3.150 (0,1%)	3180 (0,1%)	1,2	0,7	0,7
Tenofovir+Lamivudina	300mg+300mg	Comprimido	75	378.600 (18,6%)	508.530 (23,4%)	637.680 (26,0%)	170,4	228,8	287,0
Tenofovir+Lamivudina+ Efavirenz	300mg+300mg +600mg	comprimido	61	418.710 (20,6%)	343.170 (15,8%)	322.200 (13,1%)	306,5	251,2	235,9

Zidovudina	100mg	cápsula	29	3.400 (0,2%)	1.900 (0,1%)	400 (0%)	0,1	0,1	0,0
Zidovudina + Lamivudina	300mg+150mg	Comprimido	49,5	144.840 (7,1%)	125.520 (5,8%)	121.500 (5,0%)	32,3	28,0	27,1
			Totalização	2.033.891	2.174.449	2.454.232	601,8	602,4	653,8

Fonte: Próprio autor (2022)

Tabela 4. Estimativa de eliminação anual na forma inalterada dos ARV em Belo Horizonte e Brasil no ano de 2020

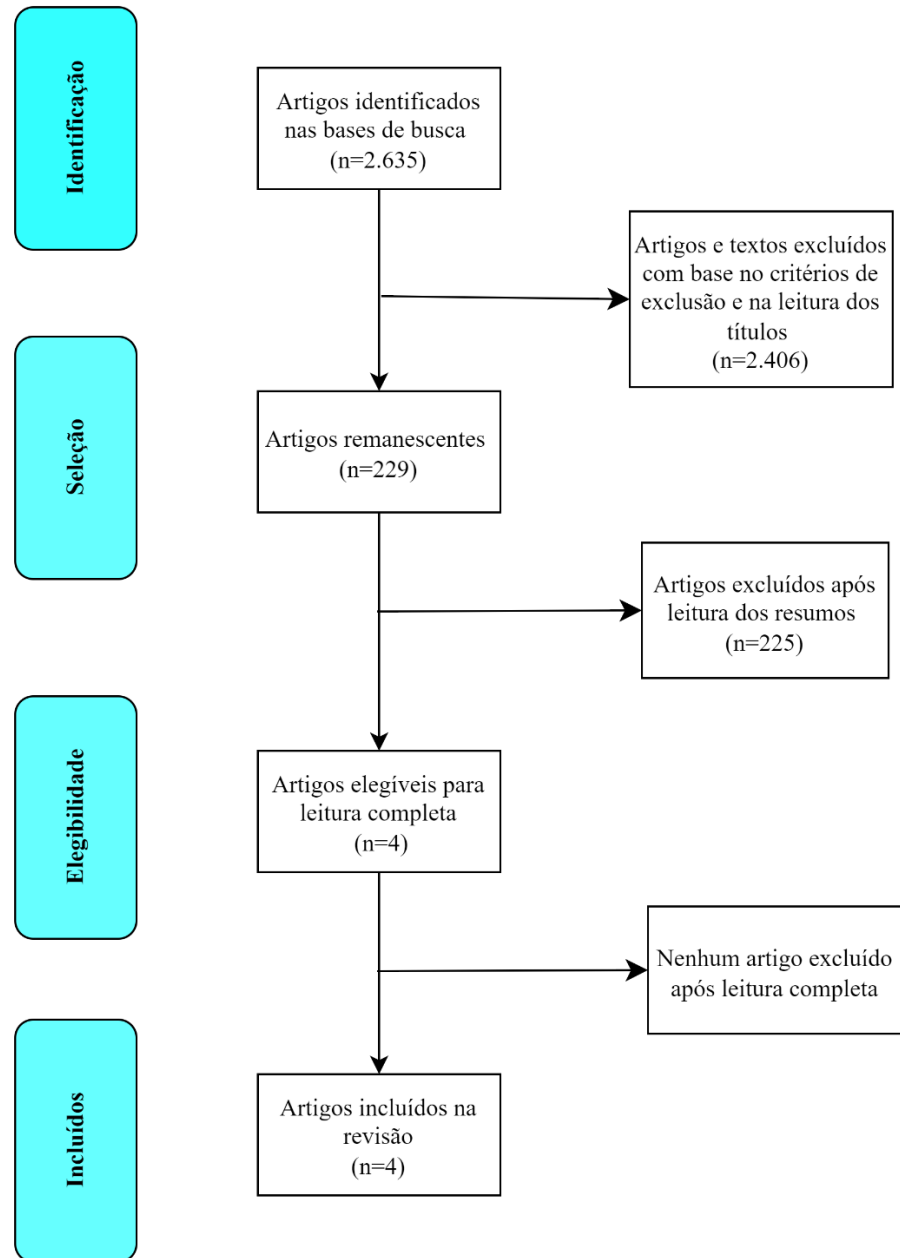
			Estimativa anual de Belo Horizonte		Estimativa anual do Brasil	
Fármaco	Dose diária (mg)	Eliminação na forma inalterada	Unidades farmacotécnicas	Eliminação em (Kg) no meio ambiente	Unidades farmacotécnicas	Eliminação em (Kg) no meio ambiente
Dolutegravir	50	54%	4,702,295	127.0	243,016,635	6,561.4
Tenofovir	300	75%	4,702,295	1058.0	243,016,635	54,678.7
Lamivudina	300	70%	4,702,295	987.5	243,016,635	51,033.5
			Total	2,175.5	Total	112,273.6

Fonte: Próprio autor (2022).

Essas estimativas corroboram as descritas para a África do Sul, o país africano com o mais extenso programa de combate e prevenção à infecção pelo HIV, que atende mais de 5,25 milhões de PVHIV com TARV, onde se estima que sejam consumidas 4,32 toneladas de ARVs diariamente, o equivalente a aproximadamente 1.576 toneladas por ano (NCUBE et al., 2018). Esses fármacos, embora liberados em quantidades significativas no meio ambiente, são sucessivamente diluídos nos efluentes e corpos hídricos e encontrados em ng/mL e pg/mL (NANNOU et al., 2020). Considerando ainda que muitos dos sistemas de tratamento de efluentes, esgoto e água não são projetados para eliminar esse tipo de contaminante, além das características recalcitrantes de alguns ARVs, há riscos iminentes para o desenvolvimento de cepas virais resistentes e possíveis alterações no ecossistema em contato com esses poluentes (MURIUKI et al., 2020; NANNOU et al., 2020; NCUBE et al., 2018).

Em relação aos estudos ecotoxicológicos existentes sobre os ARVs dispensados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e incluídos na RENAME (2020), após pesquisa em bases de dados, selecionamos quatro artigos com resultados de toxicidade aguda ou crônica em modelos ecotoxicológicos envolvendo ARVs, figura 2. Não foi observada nenhuma menção de ecotoxicologia envolvendo os ARVs atazanavir, daclatasavir, didanosina, enfurvitide, emtricitrbina, lopinavir, saquinavir e sofosvubir.

Figura 2. Fluxo da seleção dos artigos de Ecotoxicidade para os Antirretrovirais selecionados



Fonte: Próprio autor (2022).

Tabela 5. Dados completos a respeito da ecotoxicidade dos antirretrovirais dispensados pelo Sistema Único de Saúde no Brasil

Antirretroviral	Organismo testado	Tipo de organismo	Tipo de estudo	Tempo	Parâmetro	Resultado (mg/L)	Metodologia	Referência
Abacavir	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>100		(MINGUEZ et al., 2016)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alga	Agudo	72h	CE ₅₀	57,32		
	<i>Artemia salina</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>100		
	<i>Skeletonema marinoi</i>	Bactéria	Agudo	72h	CE ₅₀	NA		
Atazanavir	SR							(FASS, 2016)
Daclatasvir	SR							
Darunavir	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alga	Agudo	72h	CE ₅₀	>43	OECD 201	
					CENO	43	OECD 202	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>44	OECD 202	
					CENO	2,6		
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>38	OECD 203	
					CENO	38	OECD 203	
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	19	OECD 211		
<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	Crônico	28 dias	CENO	9,4	OECD 210		
Didanosina	SR							
Dolutegravir	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alga	Agudo	96h	CI ₅₀	0,233	OECD 201	(FASS, 2016)
					CENO	0,095	OECD 201	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>6,430	OECD 202	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	0,834	OECD 211	
	<i>Juvenile Pimephales promelas</i>	Peixe	Crônico	28 dias	CENO	0,22	OECD 210	
Efavirenz	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga	Crônico	12 dias	CE ₅₀	>0,026	FDA 4.01	(FASS, 2016)
					CENO	0,026	FDA 4.01	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	1,1	FDA 4.08	
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	0,85	FDA 4.11	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	0,16	OECD 211	
	<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	Crônico	33 dias	CENO	0,07	OECD 210	
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Peixe	Crônico	7 dias	CEO	0,0000103		(ROBSON; BARNHORN; RN;

Emtricitabina	SR								
Enfuvirtida	SR								
Etravirina	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Alga	Agudo	72h	CE ₅₀	>0,0049	OECD 201	(FASS, 2016)	
					CENO	0,0049	OECD 202		
		Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	0,0091	OECD 211		
					CENO	0,01	OECD 210		
Fosamprenavir	<i>Selenastrum caprocornutum</i>	Alga	Agudo	72h	Cl ₅₀	>100	OECD 201	(FASS, 2016)	
					CENO	100	OECD 201		
		Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>109	OECD 202		
					CENO	109	OECD 202		
		Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>100	OECD 203		
					CENO	100	OECD 203		
Crustáceo	Crônico	7 dias	CENO	100	EPA 1002				
Lamivudina	<i>Selenastrum caprocornutum</i>	Alga	Agudo	72h	Cl ₅₀	>96,9	OECD 201	(FASS, 2016)	
					CENO	>96,9	OECD 201		
		Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>1000	OECD 202		
					CENO	>1000	OECD202		
		Crustáceo	Agudo	96h	CL ₅₀	>97,7	OECD 203		
					CENO	97,7	OECD 203		
		Crustáceo	Crônico	7 dias	CE ₅₀	>100	EPA 1002		
					CENO	100	EPA 1002		
		Crustáceo	Crônico	21 dias	CE ₅₀	>100	OECD 211		
					CENO	100	OECD 211		
Peixe	Crônico	96h	CL ₅₀	>10	OECD 210				
			CENO	10	OECD 210				
Lopinavir	SR								
Maraviroque	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alga	Agudo	72h	Cl ₅₀	>115	OECD 201	(FASS, 2016)	
					CENO	>69	OECD 202		
		Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>73	OECD 203		
					CENO	92	EPA 1002		
Nevirapina	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga	Crônico	10 dias	CE ₅₀	>43	FDA 4.01	(FASS, 2016)	
					CENO	43	FDA 4.01		
		Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	76,9	92/69/EEC		
					CENO	76,9	92/69/EEC		
		Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>65	92/69/EEC		
Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>99	FDA 4.11				

Nevirapina	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Peixe	Crônico	30 dias	CENO	1,48x10 ⁻⁶		(NIBAMU REKE; BARNHOORN; WAGENAR, 2019)
Raltegravir	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga	Agudo	96h	CE ₅₀	66	OECD 201	(FASS, 2016)
					CENO	3,8	OECD 201	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CL ₅₀	>100	OECD 202	
	<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>100	OECD 203	
	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	>100	OECD 203	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	9,5	OECD 211	
	<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	Crônico	33 dias	CENO	9,3	OECD 210	
Ritonavir	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	>1,5	FDA 4.08	(FASS, 2016)
	<i>Hyalella azteca</i>	Crustáceo	Agudo	96h	CENO	1,59	FDA 4.10	
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Peixe	Agudo	24,48,7 2,96h	CL ₅₀	>1,63	FDA 4.11	
Saquinavir	SR							
Sofosbuvir	SR							
Tenofovir	<i>seudokirchneriella subcapitata</i>	Alga	Agudo	72h	CE ₅₀	69	OECD 201	(FASS, 2016)
					CENO	18	OECD 201	
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Crônico	21 dias	CENO	12	OECD 211	
	<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	Crônico	32 dias	CENO	9	OECD 210	
	<i>Aliivibrio fischeri</i>	Bactéria	agudo	15 min	CE ₅₀	14,83		(Silva et al., 2019)
	<i>Artemia salina</i>	Crustáceo	agudo	36h	CE ₅₀	111,82		
	<i>Microcystis novacekii</i>	Bactéria	Crônico	12 dias	CEO	161,01		
Tipranavir	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Alga	Agudo	96h	CE ₅₀	>40,4	OECD 201	(FASS, 2016)
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	Agudo	48h	CE ₅₀	5	OECD 202	
					CENO	3,96	OECD 202	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Peixe	Agudo	96h	CL ₅₀	15,4	OECD 203	
					CENO	1	OECD 203	
Zidovudina			Agudo	48h	CE ₅₀	>1.000	OECD 202	(FASS, 2016)
	<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo			CENO	16	OECD 202	
			Crônico	21 dias	CE ₅₀	>100	OECD 209	
					CENO	>16	OECD 209	

SR - Sem resultado

Fonte: Próprio autor

Considerando os parâmetros apresentados por ZUCKER (1985) (Tabela 1) relativamente à toxicidade ambiental, foi verificado pelos resultados encontrados dizer que o dolutegravir e o efavirenz são altamente tóxicos. A etravirina pode ser classificada como muito

altamente tóxica. O tipranavir e o ritonavir podem ser classificados como moderadamente tóxicos. O abacavir, o darunavir, a lamivudina, o maraviroc e o tenofovir podem ser classificados como ligeiramente tóxicos. O darunavir, a lamivudina e o maraviroc têm valores de toxicidade superiores a 38 mg/L, 96,9 mg/L e 73 mg/L, respectivamente. O fosamprenavir e a zidovudina são praticamente não tóxicos.

É de notar que a maioria dos ARV não atinge uma concentração de 0,1 mg/L nas estações de tratamento de efluentes domésticos ou no ambiente (NANNOU et al., 2020). MURIUKI et al. (2020) detectaram uma concentração de 1,4635 mg/L para a lamivudina numa estação de tratamento de efluentes no Quênia. São esperadas concentrações elevadas em estações de tratamento de efluentes industriais. Um estudo com efluentes reais de uma fábrica de produção de zidovudina e lamivudina encontrou concentrações do fármaco de 6,29 mg/L e 3,22 mg/L, respectivamente (SOUZA et al., 2010). Portanto, mesmo que um fármaco seja classificado como altamente tóxico e pelos estudos atualmente publicados, há uma indicação de que os valores das concentrações ambientais são baixos. Entretanto, concentrações mais elevadas podem ser alcançadas em efluentes industriais.

De acordo com as informações apresentadas na Tabela 5, foi observado que os fármacos darunavir, fosamprenavir, lamivudina, maraviroc, raltegravir, tenofovir e zidovudina possuem valores elevados de NOEC, que na prática não são observados no meio ambiente ou em uma estação de tratamento de efluentes domésticos (NANNOU et al., 2020). O darunavir, a lamivudina e o tenofovir apresentam valores de NOEC abaixo de 10 mg/L, que são concentrações possíveis num efluente farmacêutico. Em relação à concentração em efluentes industriais, o trabalho de Souza et al. (2010) mostra que as concentrações máximas de zidovudina e lamivudina, que são de 6,29 mg/L e 3,22 mg/L respectivamente, não se aproximam das NOECs para essas substâncias.

O dolutegravir apresentou um valor de NOEC de 0,22 mg/L para a espécie de peixe juvenil *Pimephales promelas*. É difícil considerar o resultado, uma vez que não foram encontrados na literatura dados que indiquem a sua concentração no ambiente ou nas estações de tratamento de efluentes. A etravirina apresentou um valor de NOEC de 0,0091 mg/L para o crustáceo *Daphnia magna*. Embora a concentração de NOEC seja baixa, não existem dados disponíveis sobre a concentração no ambiente e nas estações de tratamento de efluentes. Cabe ressaltar que a etravirina não é um medicamento de primeira escolha no Brasil, portanto, seu uso é reduzido.

O teste de toxicidade crônica realizado para a nevirapina foi apresentado em um trabalho de NIBAMUREKE et al. (2019). A concentração máxima da droga encontrada na água bruta na África do Sul foi usada no estudo, que foi de $1,48 \times 10^{-6}$ mg/L, determinada como NOEC. O estudo seguiu as diretrizes da OCDE para testes de toxicidade. Vale ressaltar que essa foi a única concentração avaliada (NIBAMUREKE; BARNHOORN; WAGENAAR, 2019). Não existem estudos de toxicidade aguda para as espécies de peixes utilizadas no estudo citado. No entanto, encontramos alguns estudos de toxicidade aguda com outros peixes para a nevirapina, que promove efeitos tóxicos em concentrações acima de 65 mg/L. Assim, o valor de NOEC apresentado pelo trabalho pode estar abaixo do valor real. Não há outros trabalhos ou informações a respeito da toxicidade crônica da nevirapina.

Apenas o efavirenz tem o resultado apresentado como LOEC. O estudo de ROBSON et al. (2017) teve como objetivo avaliar a influência da concentração máxima de efavirenz em corpos d'água na província de Limpopo, África do Sul (ROBSON; BARNHOORN; WAGENAAR, 2017a). A concentração máxima foi de 10,3 ng/l ($1,03 \times 10^{-5}$ mg/L). Testes realizados com *Oreochromis mossambicus* (tilápia de Moçambique) e análises histológicas mostraram que a concentração induziu efeitos deletérios no fígado do animal. Além disso, foi encontrada uma concentração de 20,6 ng/l ($2,06 \times 10^{-5}$ mg/L) que induziu efeitos no fígado e noutros órgãos. É de salientar que, este estudo não seguiu quaisquer normas internacionais para o desenvolvimento dos testes e que foram utilizadas apenas duas concentrações, a que aparece no ambiente e o seu estudo. Assim, não é possível afirmar se concentrações menores que $1,03 \times 10^{-5}$ mg/L podem causar danos às espécies. Apesar dos detalhes, o estudo obteve informações importantes sobre o medicamento.

Embora o efavirenz tenha sido analisado com base nos resultados de Robson et al. (2017), como os testes não seguiram protocolos registrados, é interessante avaliar a toxicidade crônica a partir de um segundo teste realizado seguindo protocolos reconhecidos. Como resultado, os dados obtidos através do site fass.se mostram que foram utilizados os protocolos da FDA. O teste foi realizado com algas durante 12 dias, tendo sido determinado um CE_{50} superior a 0,026 mg/L e um NOEC igual a 0,026 mg/L para a espécie *Selenastrum capricornutum*. Com base em outras pesquisas, foi observado que as concentrações encontradas no meio ambiente e em estações de tratamento de efluentes domésticos para esse fármaco não ultrapassam o valor de NOEC (NANNOU et al., 2020; SCHOEMAN; DLAMINI; OKONKWO, 2017).

4. Conclusão

Os estudos ecotoxicológicos com antirretrovirais são escassos e é necessária mais investigação com o maior número possível destes medicamentos. Com um número significativo de medicamentos utilizados por pessoas que vivem com VIH, é urgente quantificar os principais ARV nas massas de água. Com essas informações e dados ecotoxicológicos, há a possibilidade de se estabelecer critérios de risco para eventuais medidas de controle ou mitigação desses contaminantes no meio ambiente, principalmente para melhorar o tratamento de efluentes e águas dos grandes centros urbanos. A toxicidade crônica dos ARVs deve ser priorizada, principalmente daqueles com maior consumo e eliminação na forma inalterada e considerados de baixo risco em estudos de toxicidade aguda ou avaliação de risco ambiental. Tal como referido para o efavirenz, a concentração em que se observa um efeito crónico pode ser muito inferior à concentração do efeito não observado. Os estudos de toxicidade apresentados foram realizados com os fármacos isoladamente, pelo que deve ser efetuada mais investigação para compreender a capacidade tóxica destas substâncias em sistemas complexos, como comprimidos ou efluentes industriais ou domésticos.

Incentivamos fortemente o desenvolvimento de novos modelos e pesquisas ecotoxicológicas envolvendo organismos nativos dos países, a fim de ampliar o monitoramento e o conhecimento dos impactos ambientais causados por poluentes orgânicos, especialmente fármacos.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

ABNT. **Entidade responsável pela elaboração das Normas Brasileiras (ABNT NBR), elaboradas por seus Comitês Brasileiros (ABNT/CB), Organismos de Normalização Setorial (ABNT/ONS) e Comissões de Estudo Especiais (ABNT/CEE)**. Disponível em: <<https://www.abnt.org.br/>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

AKKARI, A. C. S. et al. Pharmaceutical innovation: differences between Europe, USA and 'pharmerging' countries. **Gestao e Producao**, v. 23, n. 2, p. 365–380, 2016.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

- BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2020**. Brasília-DF: Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Estratégicos, Farmacêutica e Insumos, 2019.
- BRASIL. **Indicadores e dados básicos do HIV/AIDS nos municípios brasileiros**. Disponível em: <<http://indicadores.aids.gov.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- BRASIL. **Vigilância Epidemiológica - Indicadores clínicos do HIV**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/hiv/vigilancia-epidemiologica>>. Acesso em: 20 maio. 2022.
- BRITO, N. N.; MARINHO SILVA, V. B. Processo Oxidativo Avançado E Sua Aplicação Ambiental. **REEC - Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 3, n. 1, p. 36–47, 2012.
- CONAMA. Resolução 357/2005. **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.**, n. 53, p. 58–63, 2005.
- CONAMA. Resolução 430/2011. **Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.**, n. 92, p. 89, 2011b.
- COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.
- CRONIN, M. A.; GEORGE, E. The Why and How of the Integrative Review. **Organizational Research Methods**, p. 1–25, 2020.
- FASS. **FASS.SECollaborative website of Swedish pharmaceutical companies that provides information about medicines marketed in Sweden.**, 2016. Disponível em: <<https://www.fass.se/LIF/startpage>>. Acesso em: 3 out. 2021
- FIGUEIREDO, M.; SANTOS, E. P. DOS; SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: Fundamentos e aplicação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 79–91, 2014.
- GAZOLA, L. **Análise das legislações estaduais brasileiras sob ensaios ecotoxicológicos como ferramenta no controle de lançamento de efluentes industriais**. [s.l.] Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.
- INSTITUTO TRATA BRASIL. **Ranking Do Saneamento Instituto Trata Brasil 2021 (Snis 2019)**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <https://tratabrasil.org.br/images/estudos/Ranking_saneamento_2021/Relatório_-_Ranking_Trata_Brasil_2021_v2.pdf>.
- JAIN, S. et al. Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 2, p. 1410, 2013.
- KORNIS, G. E. M.; BRAGA, M. H.; DE PAULA, P. A. B. Recent transformations in the pharmaceutical industry: an examination of the global and Brazilian experience in the 21st century. **Physis**, v. 24, n. 3, p. 885–908, 2014.
- MINGUEZ, L. et al. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 6, p. 4992–5001, 2016.
- MURIUKI, C. et al. Mass loading, distribution, and removal of antibiotics and antiretroviral drugs in selected wastewater treatment plants in Kenya. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140655, 2020.

- NANNOU, C. et al. 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.
- NCUBE, S. et al. **Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives** *Water Research* Elsevier Ltd, , 2018.
- NIBAMUREKE, U. M. C.; BARNHOORN, I. E. J.; WAGENAAR, G. M. Hatching success and survival of fish early life stages in a chronic exposure to nevirapine: a case study of the Mozambique tilapia. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 29, n. 4, p. 441–456, 2019.
- PRASSE, C. et al. 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.
- RASHED, M. N. ET AL. **Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Rijeka: IntechOpen, 2022.
- 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, n. October, p. 225–232, 2017.
- 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.
- SILVA, S. R. et al. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10, n. 12, p. 1565–1577, 2019.
- SINGH, A. K. et al. Trends in predictive biodegradation for sustainable mitigation of environmental pollutants: Recent progress and future outlook. **Science of the Total Environment**, v. 770, 2021.
- SOUZA, S. J. O. et al. Decomposição dos Antirretrovirais Lamivudina e Zidovudina pelo Processo Fotofenton Assistido no Efluente de Indústria Farmoquímica. **Revista Processos Químicos**, v. 4, n. 7, p. 59–67, 2010.
- TANG, Y. et al. Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. **Water Environment Research**, v. 91, n. 10, p. 984–991, 2019.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **The Evaluation of Toxicological Data for the Protection of Public Health**, p. 373–413, 1977.
- UNAIDS. **Global Hiv Statistics**. Disponível em: <<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>>. Acesso em: 4 mar. 2022.
- VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. 4. ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- WHITTEMORE, R.; KNAFL, K. The integrative review: Updated methodology. **Journal of Advanced Nursing**, v. 52, n. 5, p. 546–553, 2005.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. Primeira ed. São Carlos: [s.n.].
- ZENKER, A. et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environmental Management**, v. 133, p. 378–387, 2014.
- ZUCKER, E. Acute toxicity test for freshwater invertebrates. **Hazard evaluation division, standard evaluation procedure**, n. June, p. 1–12, 1985.

8 CAPÍTULO 2 – ECOTOXICIDADE DO ENTECAVIR SOBRE OS ORGANISMOS *ALIIVIBRIO FISCHERI*, *MICROCYSTIS NOVACEKII*, *ARTEMIA SALINA* E *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Cléssius Ribeiro de Souza¹, Gabriel de Souza Silva¹, Paula Von Randow Cardoso², Marcos Paulo Gomes Mol², Maria Clara Vieira Martins Starling³, Walter dos Santos Lima⁴, Cintia Aparecida de Jesus Pereira⁴, Micheline Rosa Silveira¹

1 – Programa de Pós-graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

2 – Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brasil;

3 – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil;

4 – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

Submetido a revista *ACS Chemical Health & Safety* em 04/09/2024. Situação: Em revisão por pares.

Resumo

O consumo mundial de medicamentos aumentou exponencialmente com consequente aumento desses poluentes no meio ambiente. Teve-se como objetivo neste trabalho avaliar em modelos de *Aliivibrio Fischeri*, *Microcystis novacekii*, *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* a ecotoxicidade do entecavir (ETV), um antiviral utilizado para o tratamento da hepatite B, que interfere diretamente em processos enzimáticos e na síntese de proteínas, com possíveis impactos no meio ambiente e na saúde humana. Para os testes ecotoxicológicos, os organismos foram expostos a concentrações de ETV que variaram de 0 a 300 mg/L, em intervalos de 30 minutos a 96 horas conforme o modelo utilizado. Somente os resultados de toxicidade em concentrações inferiores a 100 mg/L foram considerados ambientalmente relevantes. As análises estatísticas para os modelos *A. salina*, *M. novacekii* e *B. glabrata* foram realizadas por meio de regressão dose-resposta. A mortalidade no modelo de *B. glabrata* foi avaliada por meio do teste de Kruskal-Wallis. Para o modelo com *A. fischeri*, as análises foram realizadas considerando-se a média dos valores de bioluminescência em função do controle (amostra sem ETV), em escala logarítmica tendo como referência do ajuste o índice de determinação R², conforme procedimento padrão do Microtox®. Para todas as análises foi utilizado nível de significância de 5%. Em nenhum dos modelos biológicos expostos ao ETV foi observado toxicidade em concentrações ambientalmente relevantes (< 100 mg/L). Embora possa parecer que o ETV não represente risco ao meio ambiente devido ao seu baixo espectro

ecotoxicológico, diante da não observação de toxicidade para os modelos testados e da não detecção do ETV no meio ambiente, o uso racional, o descarte, o tratamento e a disposição final dos resíduos farmacêuticos desse fármaco, o monitoramento dos resíduos farmacêuticos nos sistemas de tratamento de esgoto e água além da melhoria desses sistemas devem ser encorajados para mitigação dos possíveis impactos ambientais, econômicos e na saúde.

Introdução

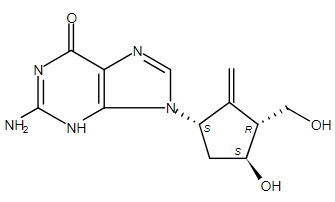
Com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico, houve um aumento exponencial no número de novos fármacos e nas quantidades produzidas em todo o mundo (AKKARI et al., 2016; KORNIS; BRAGA; DE PAULA, 2014). Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos orgânicos resistentes à degradação ambiental por meio de processos biológicos, químicos e fotolíticos gerando toxicidade (RASHED, 2022). Como exemplo, os resíduos de processos produtivos da indústria química e farmacêutica, medicamentos descartados de forma inadequada e os seus metabólitos associados ao consumo (JAIN et al., 2013; NCUBE et al., 2018; RASHED, 2022)

O entecavir (ETV) é um dos fármacos indicados para o tratamento da infecção crônica pelo vírus da hepatite B (SHAW; LOCARNINI, 2004; YAMANAKA et al., 1999). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 296 milhões de pessoas viviam com hepatite B em 2019, com 1,5 milhões de novas infecções por ano no mundo (WHO, 2023). No Brasil, no período de 2000 a 2022, foram diagnosticados 276.646 casos confirmados de hepatite B (BRASIL, 2023b), no entanto estima-se que embora haja aproximadamente 1 milhão de pessoas que vivem com a doença no país, apenas 41 mil estão em tratamento (BRASIL, 2023c).

O ETV é um antiviral análogo da 2-desoxiguanosina com atividade seletiva contra a polimerase de DNA do vírus da hepatite B (VHB), atuando como um inibidor da transcriptase reversa nucleosídeo (ITRN). Sua maior atividade antiviral dar-se-á após fosforilação intracelular, gerando um metabólito ativo na forma de trifosfato que inibe todos os estágios das atividades enzimáticas para replicação viral inibindo: seletivamente a iniciação da polimerase do DNA-VHB, a transcrição reversa do DNA da cadeia negativa do RNA mensageiro e a síntese do DNA da cadeia positiva. As doses recomendadas são de 0,5 mg/dia a 1,0 mg/dia para doença hepática compensada e doença hepática descompensada, respectivamente. Cerca de 68 a 73% do fármaco é eliminado na forma inalterada pelos rins, sendo a depuração renal independente da dose, sugerindo que o ETV passa tanto por filtração glomerular quanto por secreção da rede

tubular (SIMS; WOODLAND, 2006). Os valores de pKa e LogK_{ow}, descritos na figura 1, sugerem que o ETV persiste no meio ambiente na forma não ionizada (NCBI, 2022).

Figura 1 – Identificação e propriedades físico-químicas do entecavir

Número CAS	Estrutura molecular	Peso molecular	Fórmula química	Solubilidade em água 25°C	pK _a	LogK _{ow}
142217-69-4		277,28 g/mol	C ₁₂ H ₁₅ N ₅ O ₃	2,4 mg/ml	8,0	-0,8

Fonte: NCBI (2022)

Não foram encontrados na literatura dados referentes a concentrações de ETV em águas superficiais ou esgoto, nem estudos ecotoxicológicos envolvendo o fármaco.

Como alternativa aos modelos ecotoxicológicos tradicionais, o *Biomphalaria glabrata*, um molusco pulmonado, hermafrodita, pertencente à família Planorbidae que se alimenta de bactérias, algas, vegetais, fragmentos de animais e vegetais em decomposição em condições naturais raspando o substrato com a rádula (THOMAS; NWANKO; STERRY, 1985) está sendo utilizado em estudos ecotoxicológico de monitoramento ambiental e de exposição a fármacos (RIVERO-WENDT et al., 2014; SOUZA-SILVA et al., 2023a, 2023b; TALLARICO et al., 2014). Considerando os requisitos apresentados por BELDEN (2020) para utilização de espécies nos estudos ecotoxicológicos, esse molusco apresenta-se como uma espécie potencialmente susceptível à padronização por ser biologicamente e fisiologicamente bem conhecida, estar disponível, praticamente, em todas as estações do ano, ser de fácil tratamento e manuseio laboratorial, apresentar sensibilidade a contaminantes e não estar na lista de espécies protegidas, as quais requereriam autorizações especiais dos órgãos governamentais.

Considerando a possível presença do ETV no ambiente aquático, um antiviral que interfere diretamente em processos enzimáticos e na síntese de proteínas, com possíveis impactos no meio ambiente e na saúde humana, e a ausência de estudos ecotoxicológicos para esse fármaco, teve-se como objetivo neste estudo avaliar a ecotoxicidade do ETV nos modelos *Aliivibrio Fischeri*, *Microcystis novacekii*, *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*.

Metodologia

Design do estudo

O ETV, com 99,88% de pureza, foi analisado e disponibilizado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) atendendo a todos os requisitos de qualidade, como identificação, teor, umidade, substâncias relacionadas, rotação óptica específica, cloreto e cinzas sulfatadas, especificados pela farmacopeia europeia. Para cada modelo biológico estudado o ETV foi solubilizado no meio mais adequado para o desenvolvimento do organismo de modo que se mantivesse o equilíbrio homeostático. Para os estudos em *A. fischeri* e *A. salina* o ETV foi solubilizado em solução salina de cloreto de sódio a 2% e 3,5%, respectivamente (ABNT, 2021a; ISO 11348-3, 2007). Para os estudos em *M. novacekii* foi utilizado meio de cultura ASM-1, pH = $8,0 \pm 0,2$ (CARMICHAEL; GORHAM, 1974). Já para os estudos em *B. glabrata*, o ETV foi solubilizado em água filtrada livre de cloro, pH = $7,1 \pm 0,1$ (SOUZA-SILVA et al., 2023b). Para o preparo das soluções estoque, o ETV foi quantitativamente pesado e transferido para balões volumétricos, aquecidos a 50 ± 5 °C, agitados magneticamente (700 rpm) até completa solubilização, obtendo para os diferentes meios a concentração final de 600 mg/L.

Os organismos foram expostos a concentrações de ETV que variaram de 0 a 300 mg/L. Somente resultados de toxicidade em concentrações inferiores a 100 mg/L foram consideradas ambientalmente relevantes (UNITED-NATIONS, 2023).

Aliivibrio fischeri – Toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade aguda em *A. fischeri* foram realizados seguindo o método Microtox® de acordo com o procedimento padrão internacional ISO/OIN 11348-3 (2007), no qual se avalia a capacidade e intensidade da bioluminescência desenvolvidas pelos organismos quando expostos a um xenobiótico. Sob condições favoráveis, com concentrações de oxigênio superiores a 0,5 mg/L, a bactéria *A. fischeri* emite luz, a qual pode ser quantificada por espectrometria na região do visível (490 nm). O teste é rápido, sensível e reprodutível (ABBAS et al., 2018). O processo de bioluminescência está relacionado ao sistema de transporte de elétrons na respiração celular que por sua vez estão diretamente relacionadas ao metabolismo celular. A diminuição da bioluminescência corresponde a diminuição da respiração celular, podendo ser estabelecido um grau de toxicidade de uma substância a essa espécie de organismo (ABBAS et al., 2018; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006). Foram utilizados o equipamento Microtox® LX (Modern Water, Londres/Reino Unido) e cepas *A. fischeri* liofilizadas e conservadas a -20°C (kit Biolux® Lyo 5, Umwelt – Santa Catarina/Brasil, lote 217). O teste foi realizado conforme a norma ABNT NBR 15411-3 seguindo o protocolo

analítico do software do equipamento Microtox®. A cultura foi suspensa em solução salina 2% e os organismos expostos as diferentes concentrações de ETV a partir da solução estoque de 600 mg/L. As concentrações obtidas considerando-se as diluições do preparo do teste no Microtox® foram de 0; 30,71; 61,43; 122,85 e 245,70 mg/L. A bioluminescência foi quantificada em 5, 15 e 30 minutos, sendo os testes realizados em duplicata. A solução salina de NaCl a 2% contendo *A. fischeri* foi utilizada como controle negativo.

A qualidade do lote da cepa *A. fischeri* foi avaliada conforme ABNT NBR 15411-3: Ecotoxicologia aquática - Efeito inibitório sobre a bioluminescência de *A. fischeri*, com inibição da bioluminescência entre 20 a 80% com exposição às substâncias de referência sulfato de zinco, fenol e dicromato de potássio, todos a 2%. (ABNT, 2021a).

***Microcystis novacekii* – Inibição de crescimento**

A cultura de *M. novacekii*, foi isolada de amostras de água coletadas no Lago Dom Helvécio, no Parque Estadual do Rio Doce (42°, 35', 595''; 19°, 46', 419''), Minas Gerais, Sudeste do Brasil) em maio de 2004. A cultura foi mantida em câmaras de germinação a 23,0°C ± 2°C com fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro, intensidade de luz = 45 ± 5 µmol/m²/s) no Laboratório de Saúde Pública/Água da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O meio de cultura ASM-1, pH = 8,0 ± 0,2 foi utilizado para o cultivo e ensaios, utilizando como referência o protocolo nº 201 (OECD, 2006) para realização dos testes. As bactérias foram incubadas em erlenmayres de 250 mL contendo 100 mL de volume final com concentrações iniciais de *M. novacekii* de 10⁶ células/mL e de ETV a 0, 1,2, 12, 24, 60, 120, 180 e 300 mg/L, em triplicata. As amostras foram incubadas a 22,0°C ± 1,0°C, com fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro) e agitação constante (140 rpm) por 72 horas (3 dias) para teste agudo e por 336 horas (14 dias) para teste crônico. O crescimento celular foi avaliado no primeiro e no último dia de exposição avaliando as densidades ópticas por espectrometria do visível a 680 nm, por meio do espectrofotômetro Spectroquant - Merck Millipore, Darmstadt/Alemanha. As concentrações de cultura (células por mililitro) (y) foram calculadas a partir da densidade celular com base em curvas de crescimento previamente estabelecidas (X) utilizando a equação: $y = 1 \times 10^7 X - 423719$ (R² = 0,999). Foram construídas taxas médias de crescimento e curvas de inibição de crescimento em função das concentrações resultantes da exposição. O coeficiente de taxa de crescimento (µ) foi calculado após 72 horas de exposição e após 336 horas. O meio de cultura ASM-1 foi utilizado como controle negativo e o reagente sulfato de cobre (1 mg/L) como controle positivo.

A viabilidade das células após 14 dias de exposição ao ETV foi avaliada pelo método do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio tetrazólio (MTT). Foi utilizado o corante MTT fabricado pela Sigma Aldrich, conforme método descrito por Barmshuri et al. (2023) com alterações. Soluções de MTT (5 mg/mL) foram preparadas em meio de cultura ASM-1 com auxílio de um vórtice para solubilizar o corante, em seguida a solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm. As células foram expostas ao ETV por 14 dias (336 horas) nas mesmas condições aplicadas para o ensaio de inibição do crescimento, após este tempo de incubação, 1 mL de cada grupo foi transferido para eppendorf de 1,5 mL em triplicata. Em cada grupo contendo a amostra e ETV ou controle negativo foram adicionados 50 µL de MTT e depois incubados em uma capela a 37 °C por 4 horas no escuro. Após a incubação, os eppendorf foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, 200 µL de solvente dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados aos pellets presentes nos microtubos e incubados por mais 5 min em temperatura ambiente, no escuro. Após esse tempo, os microtubos foram rigorosamente agitados em vórtex por 10 segundos seguido de centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para um leitor de placas de 96 poços e tiveram a absorbância mensurada a 570 nm. Foi preparado branco contendo os reagentes e o ETV, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para avaliação da sensibilidade da cepa de *M. novacekii*, o dicromato de potássio foi utilizado como substância de referência no teste de inibição para cianobactéria, tendo como critério de aceitação coeficiente de variação < 30% em 30 dias (OECD, 2006).

***Artemia salina* – Toxicidade aguda**

Os processos de eclosão dos cistos e manutenção dos náuplios foram realizados conforme estabelecido na ABNT NBR 16530:2021 (Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia sp.* (Crustacea, Brachiopoda) (ABNT, 2021b). Para o teste de toxicidade, náuplios com 48 horas de vida foram distribuídos em tubos de ensaio de vidro contendo diferentes concentrações de ETV solubilizado em solução salina a 3,5%. Em cada tubo foram adicionados 10 indivíduos. Para cada concentração de ETV foram utilizadas quatro réplicas. Foram utilizadas as concentrações de 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L de ETV, sendo a concentração 0 (zero) considerada como controle negativo, ou seja, sem adição do ETV. Um grupo contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) a 2% P/V foi utilizado como controle positivo. Após 48 horas de exposição foi verificada a mobilidade dos náuplios,

observando o número de indivíduos imóveis e móveis. Os testes de toxicidade aguda foram realizados em triplicata conforme norma ABNT NBR 16530 (ABNT, 2021b).

Conforme estabelecido na ABNT NBR 16530 para *A. salina*, foi utilizada a carta controle elaborada com o uso de SDS a 2% como substância de referência (ABNT, 2021b).

***Biomphalaria glabrata* – Toxicidade aguda**

Indivíduos da linhagem Belo Horizonte de *B. glabrata* obtida na Lagoa da Pampulha (WGS84 19°51'09" S; 43°58'42" W) e mantida por sucessivas gerações no Laboratório de Helmintologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG foram utilizados no bioensaio. Os indivíduos foram mantidos em tanques (0,75 x 0,75 x 0,65 m) contendo 200 litros de água filtrada, livre de cloro, pH $7,1 \pm 0,1$ e temperatura de 25 ± 2 °C. A limpeza ocorreu semanalmente com reposição total de água. Todos os moluscos mantidos em cultivo foram alimentados diariamente com alface fresca (*Lactuca sativa*) isenta de agrotóxicos e limpos com solução de ácido acético 0,005%, *ad libitum*. Uma vez por semana, a dieta dos moluscos foi complementada com aproximadamente 200 mg de carbonato de cálcio por molusco (SOUZA-SILVA et al., 2023b).

O ensaio de toxicidade aguda foi realizado utilizando recém-nascidos com aproximadamente 24 horas de vida. Para obtenção dos recém-nascidos, os ovos depositados em folhas de isopor no aquário de criação foram recolhidos e transferidos para outro aquário até a eclosão, nas mesmas condições. Após eclosão, os recém-nascidos foram transferidos em grupos de 5 indivíduos por poço para placas de cultura de 24 poços contendo 3 mL das soluções de ETV nas concentrações de 1,5; 15; 60; 120 e 240 mg/L. O grupo controle negativo foi tratado nas mesmas condições dos demais grupos, sendo expostos apenas a água filtrada e sem cloro. O grupo controle positivo foi exposto a solução de sulfato de cobre II na concentração de 2,5 mg/L, em uma placa de cultura separada dos demais grupos, nas mesmas condições de tempo, luz e temperatura dos demais grupos.

Para cada concentração teste, dois poços contendo 5 caramujos recém-nascidos em cada ($n = 10$ por grupo), foram preparados com ETV (grupo tratamento), água potável (grupo controle negativo) ou sulfato de cobre II (grupo controle positivo) e expostos por 96 horas. O método descrito por Souza-Silva et al. (2023a) foi utilizado para verificar o comportamento do molusco como critério de toxicidade. Os moluscos foram observados diariamente quanto à sua localização no aquário para determinar seu comportamento diante da exposição ao ETV, sendo

classificados em (i) em estado de repouso, molusco localizado no fundo do aquário; (ii) respirador, molusco localizado na superfície da água; e (iii) fuga, molusco localizado inteiramente fora d'água; (iv) mortalidade, caracterizada por imobilidade absoluta, sem resposta a estímulos mecânicos, extravasamento da hemolinfa, perda da coloração, concha vazia ou ausência de batimentos cardíacos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os critérios de aceitação do teste foram: (I) A mortalidade média do controle negativo (considerando todas as réplicas do controle) não deveria exceder a 20% no final do teste; (II) A mortalidade média do controle positivo (considerando todas as réplicas do controle) não deveria ser inferior a 80% no final do teste; (III) A temperatura média da água deveria ser de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante todo o teste, tanto no grupo de controle quanto no grupo de exposição. Desvio transitório de temperatura (por 1 a 2 dias) deste valor médio poderia ocorrer ocasionalmente, mas não deveria ser superior a $\pm 2^\circ\text{C}$.

Análises estatísticas

As análises estatísticas para os modelos *A. salina*, *M. novacekii* e *B. glabrata* foram realizadas utilizando o software R (versão 4.2.2) por meio dos modelos estatísticos de regressão dose-resposta que representam a relação entre a variável independente (dose ou concentração) e a variável dependente (resposta ou efeito). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. O crescimento celular de *M. novacekii* foi avaliado por meio de escala logarítmica da dose em função do tempo, com análise de variância ANOVA e posthoc de Tukey. A mortalidade entre as diferentes doses no teste com *B. glabrata* foi avaliada por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados obtidos em cada tratamento foram comparados estatisticamente com o grupo controle negativo, utilizando análise de variância para dados não paramétricos (Wilcoxon). Os modelos log-logístico, log-normal e Weibull foram testados utilizando o pacote de extensão “drc” no software estatístico R para estimar a melhor função de montagem, por meio da função AIC, com avaliação ANOVA para o modelo utilizado (RITZ et al., 2015; SAUDER; DEMARS, 2019). Para o modelo *A. fischeri*, as análises foram realizadas com base na média dos valores de bioluminescência em função do controle (amostra sem ETV), em escala logarítmica tendo como referência do ajuste o índice de determinação R^2 , conforme procedimento padrão do Microtox®. Para todas as análises foi utilizado nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

Nos ensaios de toxicidade aguda para ETV nos modelos biológicos *A. fischeri*, *A. salina*, *M. novacekii* e *B. glabrata* não foi verificada toxicidade aguda em concentrações ambientalmente relevantes (< 100 mg/L).

Considerando a estimativa de consumo do medicamento ETV, a dose diária, a duração do tratamento, a taxa de eliminação, a expectativa de diluição nos corpos d'água superficiais (córregos, rios, lagos e mares) além dos quantitativos detectados de outros fármacos de maior circulação (ESCHER et al., 2019; WILKINSON et al., 2022), estima-se que o ETV esteja presente no meio ambiente aquático na ordem de pg/L ou em níveis indetectáveis. No estudo para detecção de nove antirretrovirais em influentes e efluentes na cidade de Guangzhou, China, cuja população é estimada em 19 milhões de habitantes, o ETV não foi detectado, mesmo com prevalência de hepatite B na ordem de 11,10% (LIU et al., 2022; YAO et al., 2021). A falta de registros na literatura de dados reais da concentração do ETV no meio ambiente, impossibilitou determinar seu potencial risco ambiental, seja por ferramentas computacionais como o ECOSAR ou pela avaliação do risco ambiental por meio do quociente de risco (QR) (REUSCHENBACH et al., 2008; RIVA et al., 2019).

Corroborando com García et al. (2016), todos esses organismos estudados têm papel importante nos ecossistemas. O olhar aos testes de ecotoxicidade precisa ser continuamente ampliado da prática do monitoramento, ações regulatórias, da produção de dados científicos básicos para a visão holística dos ecossistemas. Uma pequena perturbação, como por exemplo um possível efeito crônico para *A. salina*, pode indicar possível toxicidade a outros organismos semelhantes que, em tese, poderiam desestabilizar o ecossistema com alterações na cadeia alimentar, incluindo a decomposição da matéria orgânica por bactérias e fungos, alterações no equilíbrio de gênero das espécies, nas simbioses e mutualismos.

A ausência de estudos na literatura de antivirais com estrutura semelhante como o aciclovir e o adefovir dificulta a comparação dos modelos biológicos. Além disso, havendo esses estudos, eles poderiam auxiliar na elucidação de dúvidas sobre os reais mecanismos que levam a toxicidade aos organismos não alvos.

Toxicidade aguda em *Aliivibrio fischeri*

Os controles de sensibilidade da cepa exposta ao sulfato de zinco, fenol e dicromato de potássio apresentaram resultados de 75,46%, 41,09% e 39,10%, respectivamente e ficaram dentro da especificação do teste.

Não foi observada toxicidade ao ETV em *A. fischeri*. Mesmo após 30 minutos de exposição, a maior concentração testada (245,7 mg/L) não apresentou efeito significativo na inibição da bioluminescência acima dos 50%. A inibição máxima determinada foi de aproximadamente 30%. Embora os cálculos estatísticos realizados no software do Microtox® tenham estimado a CE₅₀ em 16,04%, o coeficiente de determinação apresentado foi muito baixo ($R^2 = 0,0287$) indicando a não toxicidade aguda em *A. fischeri*.

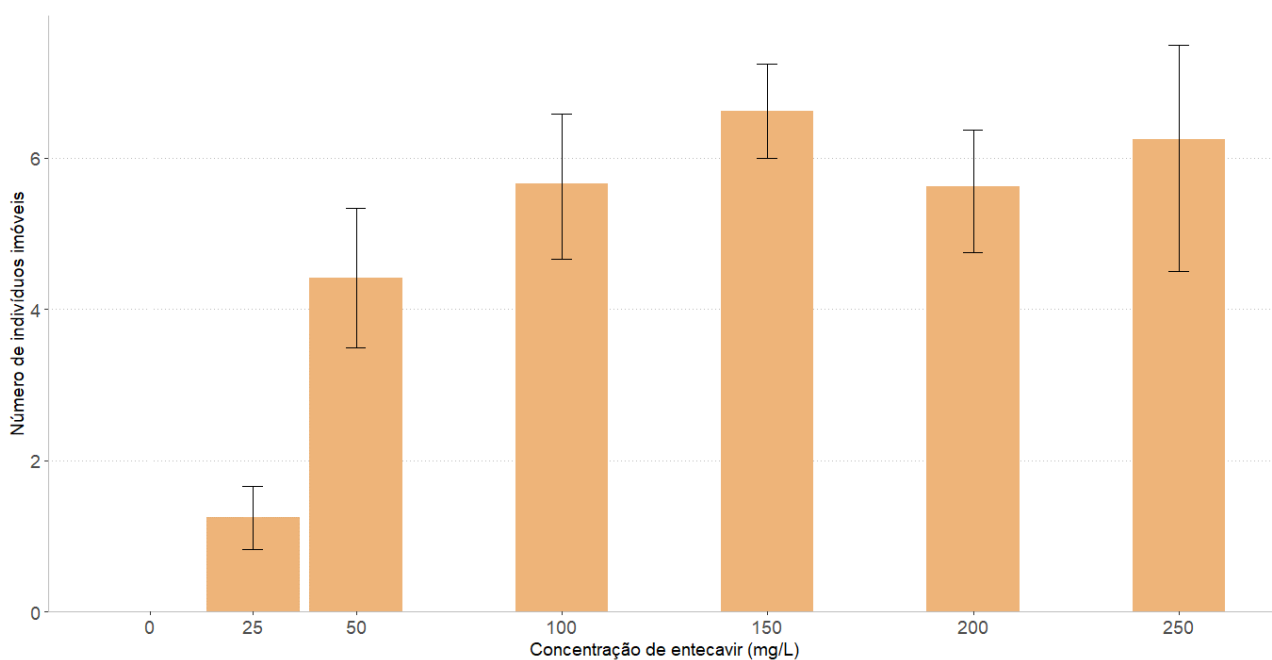
Estudos tem demonstrado menor sensibilidade ou maior resiliência do *A. fischeri* para algumas substâncias, quando comparadas com organismos superiores como crustáceos, moluscos e peixes. Gheorghe et al. (2016), demonstraram que a carbamazepina ($\text{LogK}_{ow} = 2,45$) e a cafeína ($\text{LogK}_{ow} = 0,01$) foram mais tóxicas para *Daphnia magna* do que para *A. fischeri*. Vurm et al. (2021) demonstraram maior sensibilidade da *A. salina* para diversos herbicidas (Rundup®, Kaput®premium, Lotrel 300, Glifosato, Dicamba, Clopiralide, ácido mononóico) comparados com *A. fischeri* (GHEORGHE et al., 2016; VURM; TAJNAIOVÁ; KOFROŇOVÁ, 2021). Até o momento, não há um mecanismo que possa explicar esse comportamento de resiliência do *A. fischeri*, sugerindo que, a complexidade biológica de cada organismo, as condições do meio ambiente, temperatura, pH, osmolaridade, os grupos funcionais presentes nas moléculas e interações com outras moléculas e ambiente, podem influenciar nas respostas biológicas frente aos xenobióticos (DONG et al., 2019; GARCÍA; GARCÍA-ENCINA; IRUSTA-MATA, 2016; GHEORGHE et al., 2016; NCBI, 2022, 2024a, 2024b; ORTIZ DE GARCÍA et al., 2014).

Toxicidade aguda em *Artemia salina*

Todos os indivíduos de *A. salina* expostos ao controle negativo mantiveram sua mobilidade, enquanto aqueles expostos ao SDS 2% ficaram imóveis. Ambos os controles atenderam as determinações da norma técnica ABNT NBR 16530:2021. Embora os resultados demonstrem certa inibição de movimento das artemias, conforme figura 1, as análises estatísticas realizadas por meio do modelo dose-resposta não apresentaram resultado satisfatório. Não foi possível estabelecer valores de CE₅₀ porque não houve uma resposta efetiva máxima (100%) sobre os indivíduos na maior concentração de exposição. O valor

máximo médio alcançou aproximadamente 60%, mesmo os indivíduos sendo expostos a concentrações de ETV cinco vezes maiores à aquela ambientalmente relevantes (≤ 100 mg/L). A CE_{50} representa a concentração que provoca a imobilidade de 50% das artemias entre o limite superior estimado e o limite inferior fixo em zero. Como não houve a imobilização total das artemias nas maiores concentrações de exposição o provável valor da CE_{50} correspondeu à concentração relativa que resultou na imobilidade de 50%, com base na escala de probabilidade estimados a partir dos dados. Segundo Ritz et al. (2015), para análises dose resposta do tipo binomial os valores de CE_{50} absolutos são frequentemente mais relevantes do que os relativos.

Figura 1: Imobilização de *Artemia salina* expostas em diferentes concentrações de entecavir



Mesmo não sendo possível a estimação da CE_{50} do entecavir em *A. salina*, os resultados de não toxicidade se assemelham a outros estudos de baixa toxicidade para outros antivirais demonstrados por SILVA et al. (2019) e MINGUES et al. (2016). SILVA et al. (2019), demonstrou CE_{50} para o antirretroviral tenofovir de 111,82 (103,18 – 120,45) mg/L. MINGUES et al. (2016) apresentaram resultados de CE_{50} acima de 100 mg/L para antirretroviral abacavir e o antiviral aciclovir.

Esses resultados não eximem a preocupação dos efeitos ecotoxicológicos de fármacos em espécies não alvo. Semelhante ao processo de resistência bacteriana a antimicrobianos, os antivirais podem causar o desenvolvimento de cepas resistentes ou ainda desencadear o

desequilíbrio do ecossistema local por meio de efeitos deletérios nas cadeias tróficas (NCUBE et al., 2018). Em outras classes de fármacos como antibióticos, hormônio e agrotóxicos concentrações na ordem de ng/L pode-se observar efeitos nos organismos aquáticos (LORCA et al., 2023; ROBSON; BARNHOORN; WAGENAAR, 2017; VERMEIRSEN et al., 2019) .

Para a determinação da concentração de efeito não observado (CENO), os resultados sugerem concentração de ETV menor que 25 mg/L, uma vez que houve significância estatística entre o controle e a menor concentração de exposição. Entretanto, a adaptação dos esquemas experimentais do teste, utilizando o ajuste do modelo com concentrações mais espaçadas e menos repetições, poderia auxiliar na melhoria dos resultados (AURE et al., 2011).

Para CEO, em todas as concentrações de ETV foram observadas alterações não sendo possível estimar o seu valor pelo modelo matemático. Observou-se que a partir do valor de 50 mg/L de ETV não houve alterações significativas no número de indivíduos imóveis, corroborando com a não validação da curva dose-resposta do modelo estatístico.

Tabela 1: Resultados de *posthoc* de Games Homell com as estimativas de efeito do entecavir sobre a *Artemia salina*, os respectivos intervalos de confiança (IC) e a significância estatística entre as diferentes doses de exposição.

Dose 1 mg/L	Dose 2 mg/L	Estimativa (IC)	p-valor
0	25	1,25 (0,48 – 2,02)	<0,05
0	50	4,42 (2,59 – 6,25)	<0,05
0	100	5,67 (3,79 – 7,54)	<0,05
0	150	6,62 (5,34 – 7,91)	<0,05
0	200	5,62 (3,80 – 7,45)	<0,05
0	250	6,25 (1,13 – 11,40)	<0,05
25	50	3,17 (1,28 – 5,06)	<0,05
25	100	4,42 (2,48 – 6,35)	<0,05
25	150	5,38 (4,03 – 6,72)	<0,05
25	200	4,38 (2,54 – 6,21)	<0,05
25	250	5,00 (0,16 – 9,84)	0,05
50	100	1,25 (-1,13 – 3,63)	0,63
50	150	2,21 (0,19 – 4,23)	0,03
50	200	1,21 (-1,08 – 3,49)	0,59
50	250	1,83 (-2,50 – 6,16)	0,57
100	150	0,96 (-1,10 – 3,02)	0,71
100	200	-0,04 (-2,36 – 2,27)	1,00
100	250	0,58 (-3,74 – 4,90)	1,00
150	200	-1,00 (-2,96 – 0,96)	0,58
150	250	-0,38 (-5,00 – 4,25)	1,00

200	250	0,63 (-3,79 – 5,04)	0,99
-----	-----	---------------------	------

Toxicidade aguda em *Microcystis novacekii*

Os resultados de sensibilidade ao dicromato de potássio realizados com as cepas de *M. novacekii* apresentaram coeficiente de variação (CV) < 30% em 30 dias satisfatório com a condição do teste.

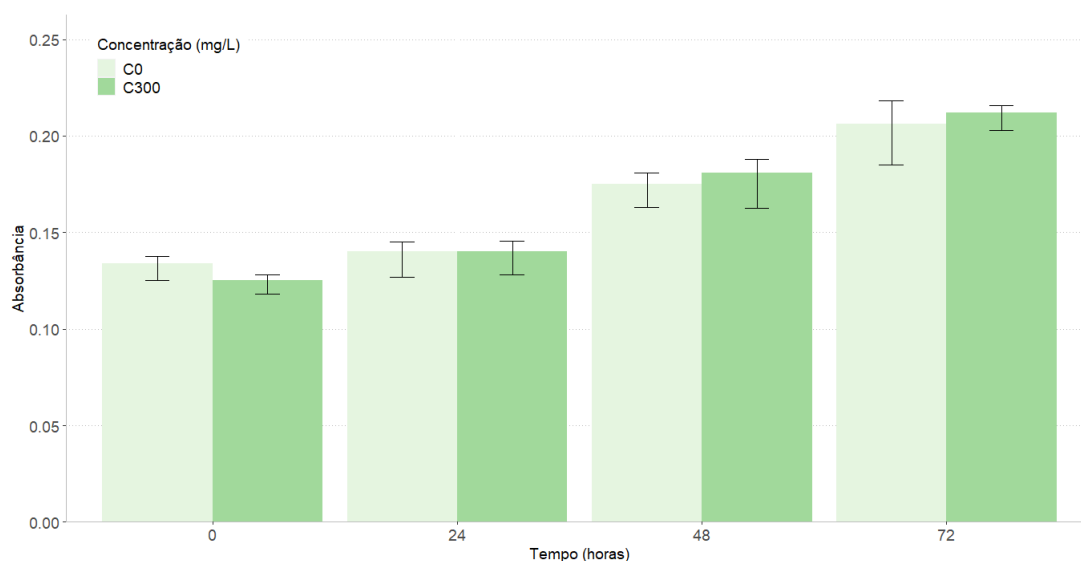
O ETV não apresentou toxicidade aguda e crônica em *M. novacekii*. As taxas de inibição de todas as concentrações de ETV calculadas para os tempos de exposição 72 (aguda) e 336 (crônica) horas foram negativas, indicando o crescimento celular e não inibição do crescimento (Tabela 2). Embora com significância estatística limítrofe, as taxas de “inibição” não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo nas diferentes concentrações ($p > 0,05$). Como esperado, em condições favoráveis de nutrientes e luz, pH entre 6,5 e 7,5, por meio da análise de *posthoc* de Tukey foram demonstradas diferenças significativas no número de células em todas as concentrações quando comparadas entre o início e os tempos de 48 e 72 horas. A figura 2 demonstra ausência de crescimento celular distinto entre o controle negativo e a maior concentração de ETV utilizada no teste de toxicidade aguda em todos os períodos analisados.

Tabela 2: Inibição de *M. novacekii* sob exposição em diferentes concentrações de entecavir por 72 horas expressa pela taxa de inibição (desvio padrão).

Concentração do ETV	Tempo		p-valor
	72 h	336 h	
	I%(DP)	I%(DP)	
0 mg/L	N/A	N/A	N/A
1,2 mg/L	-17,3 (24,1)	-5,5 (3,8)	0,513
12 mg/L	-24,9 (16,7)	-2,5 (4,2)	0,051
24 mg/L	-16,2 (18,4)	-2,6 (2,6)	0,275
60 mg/L	-24,4 (22,2)	0,6 (3,1)	0,189
120 mg/L	-16,5 (22,9)	-2,0 (5,4)	0,388
180 mg/L	-11,4 (5,3)	-0,6 (2,6)	0,051
300 mg/L	-26,2 (14,8)	-1,2 (3,8)	0,092
p-valor	0,944	0,602	

I%: Taxa de inibição; DP: Desvio padrão

Figura 2: Crescimento celular de *M. novacekii* com e sem exposição ao entecavir a 300 mg/L no período de 72 horas, fotoperíodo de 12 h, temperatura de $22,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ sob agitação.



Não foi possível apresentar comparações de estudos ecotoxicológicos de fármacos da mesma classe terapêutica do ETV em virtude da escassez desses estudos na literatura. Em um único encontrado na literatura, Reed et al. (2021), utilizando como modelo biológico a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, foi observado que a toxicidade aguda do ETV sobre o organismo apresentou um valor de CE_{50} de 110 mg/L, acima do limite de relevância ambiental (UNITED-NATIONS, 2023). Além disso, esses autores reforçam a maior tolerância de espécies de algas e cianobactérias a ação do ETV, embora o efeito e a tolerância aos xenobióticos podem variar entre os diferentes gêneros e espécies. No entanto, o valor de CE_{50} de 110 mg/L sugere baixa toxicidade do ETV para algas e cianobactérias. Esse resultado corrobora com resultados deste trabalho no qual não foi identificada toxicidade aguda do ETV para *M. novacekii*, mesmo quando expostas a concentrações de 250 mg/L. A tabela 3 apresenta resultados de estudos ecotoxicológicos de várias classes fármacos como antibióticos, antiviral, antidepressivo e anti-hipertensivo demonstrando diferenças nos resultados conforme o tipo de organismo utilizado.

Tabela 3: Ecotoxicidade aguda de fármacos em diferentes espécies de organismos aquáticos

Fármaco	Modelo biológico	Duração do teste	CE₅₀ (mg/L)	Referência
Eritromicina	<i>Chlorella vulgaris</i>	72 h	33,8	Eguchi et al. (2004)
	<i>Selenastrum capricornutum*</i>	72 h	0,0366	
Tetraciclina	<i>Chlorella sp.</i>	72 h	4,159	Gomaa, Zien-Elabdeen, Hifney, & Adam (2021)
	<i>Desmodesmus spinosus</i>	72 h	34,78	
Tobramicina	<i>Raphidocelis subcapitata*</i>	72 h	3,5	Lomba et al. (2020)
	<i>Daphnia magna</i>	48 h	520,2	
Sertralina	<i>Pseudokirchneriella subcapitata*</i>	96 h	12,1	Johnson, Sanderson, Brain, Wilson, & Solomon (2007)
	<i>Scenedesmus acutus</i>	96 h	98,9	
Aciclovir	<i>Pseudokirchneriella subcapitata*</i>	72 h	> 100	Minguez et al. (2016)
	<i>Daphnia magna</i>	48 h	64,12	
Metropolol	<i>Aliivibrio fischeri</i>	15 min.	> 100	Maszkowska et al. (2014)
	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	24 h	75	

*Mesma espécie (YAMAGISHI et al., 2020)

Os resultados da exposição das cianobactérias ao ETV por 336 horas não demonstraram toxicidade crônica. Houve crescimento exponencial semelhante, sem diferença significativa ($p > 0,05$), em todas as concentrações testadas, mesmo nas concentrações acima de 100 mg/L que, em geral, não são de relevância ambiental (UNITED-NATIONS, 2023), conforme demonstrado na Figura 3. Na avaliação da atividade celular em 14 dias de exposição, por meio do teste com corante MTT, também não foi demonstrada alteração quando comparada com a amostra controle por meio do teste de Tukey ($p > 0,05$) (Figura 4).

Figura 3: Crescimento de *M. novacekii* sem exposição ao ETV e com exposição a 300 mg/L no período de 336 horas, fotoperíodo de 12 h, temperatura de $22,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ sob agitação.

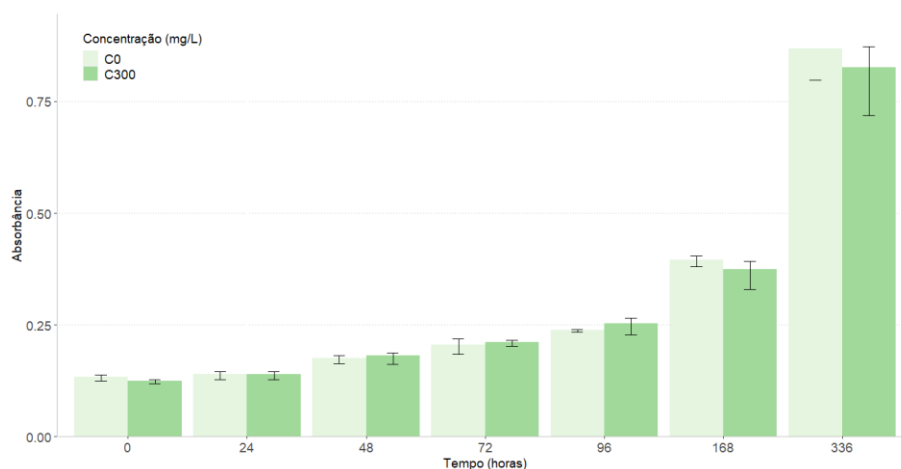
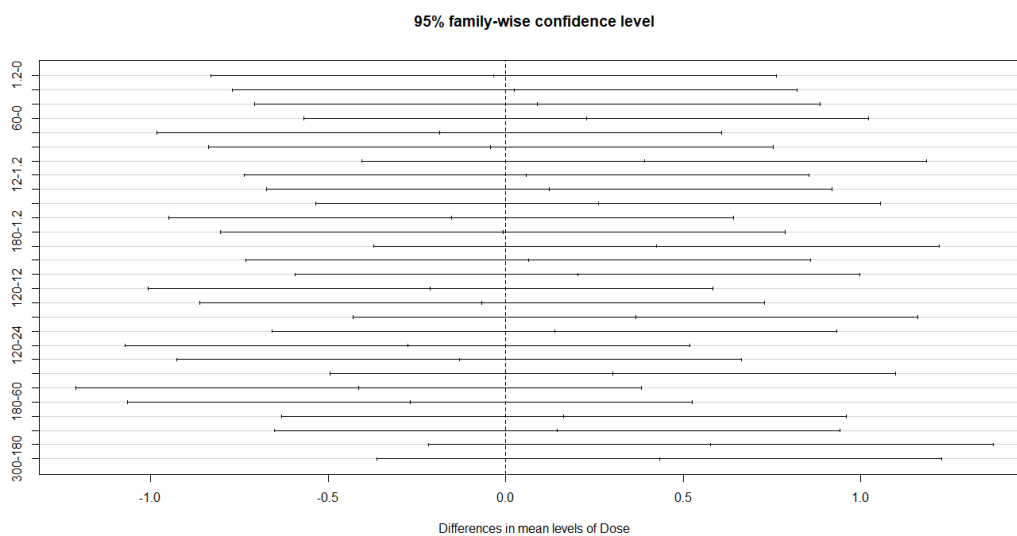


Figura 4: Análise posthoc de Tukey para atividade celular de *M. novacekii* nas diferentes concentrações de entecavir em 336 horas de exposição.



Toxicidade aguda em *Biomphalaria glabrata*

Os critérios de aceitação do teste de ecotoxicidade aguda para *B. glabrata* foram cumpridos em sua totalidade. A mortalidade média do controle negativo foi de 16,7% e do controle positivo foi de 100%. A temperatura se manteve entre 24 e 27 °C durante todo o tempo de exposição, conforme resultados expressos na tabela 4.

Tabela 4. Mortalidade e resultados comportamentais de *B. glabrata* expostos ao ETV por 96 horas, a temperatura $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sem alimentação

Concentração (mg/L)	n	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média (DP)	Mortalidade (%)	Repouso	Respiração	Fuga
0	10	2	2	1	1 (0,6)	10	3	0	0
1,5	10	3	1	3	2 (1,2)	20	2	0	0
15	10	0	1	2	1 (1,0)	10	4	0	0
60	10	0	1	0	0 (0,6)	0	1	0	0
120	10	0	1	4	2 (2,1)	20	4	0	0
240	10	3	1	1	2 (1,2)	20	3	0	0
p-valor	-					> 0,05	> 0,05	-	-

Não houve toxicidade aguda para os caramujos expostos ao ETV em concentrações ≤ 240 mg/L. As diferenças nos resultados de mortalidade e respostas comportamentais (repouso, respiração e fuga) também não foram significativas. Os resultados sugerem resiliência do espécime a ação do ETV devido a especificidade do fármaco para DNA polimerase do vírus HBV, uma vez que os estudos clínicos em células hepáticas humanas infectadas apontaram CE_{50} de $0,004 \mu\text{M}$ para o ETV, porém, por não ser um substrato, indutor ou inibidor, não afetou o sistema enzimático CYP450 (1A2, 2C9, 2C19, 3A4, 3A5 e 2B6) das células hepáticas (FUNED, 2023).

Quando a ação farmacológica das drogas é menos específica, observa-se expressão de toxicidade em organismos não alvo a exemplo da ivermectina (IVM), um antiparasitário que atua na junção neuromuscular, especificamente nos canais de cloreto dependentes de glutamato. Foi observado atividade moluscida significativa da IVM ao caramujo *B. glabrata* e ao peixe *Poecilia reticulata* em concentrações $1 \mu\text{g/mL}$ em 48 e 24 horas de exposição respectivamente (KATZ et al., 2017). Embora específico na inibição da enzima transcriptase reversa do vírus HIV, mas com inúmeras reações adversas que sugere outros sítios de ligação no organismo humano e possivelmente em outros organismos não alvo, o fumarato de tenofovir desopoxila demonstrou toxicidade crônica para *B. glabrata* em concentrações acima de 3 mg/L (SOUZA-SILVA et al., 2023a).

Limitações

Este estudo apresenta limitações que envolvem o alto custo do insumo que impossibilitou a realização de estudo de ecotoxicidade crônica para todos os modelos.

Conclusão

O ETV não apresentou toxicidade aguda para os modelos biológicos aquáticos *A. fischeri*, *M. novacekii*, *A. salina* e *B. glabrata* (recém-nascidos), $CE_{50} > 100$ mg/L. No entanto, a não confirmação de toxicidade aguda nos modelos biológicos expostos ao ETV não pode ser vista como ausência de toxicidade desse fármaco. Estudos crônicos devem ser estimulados para dar segurança de não toxicidade, inclusive, se possível com ampliação para os efeitos sobre sistemas genéticos, enzimáticos, fisiológicos, imunológicos e estresse oxidativo nas células.

Embora possa parecer que o ETV não represente risco ao meio ambiente devido ao seu baixo espectro ecotoxicológico, mesmo diante da não toxicidade nos modelos testados e da não detecção do ETV no meio ambiente, o uso racional, o descarte, o tratamento e a disposição final dos resíduos farmacêuticos, o monitoramento dos resíduos farmacêuticos nos sistemas de tratamento de esgoto e água além da melhoria desses sistemas devem ser encorajados para mitigação dos impactos ambientais, econômicos e na saúde.

Agradecimentos

A FAPEMIG, processo APQ-02426-21, pelo apoio para o desenvolvimento da pesquisa, aos Laboratórios de Ecotoxicologia da FUNED, da Escola de Engenharia Sanitária e Ambiental (UFMG) e do Laboratório de Saúde Pública /Água da Faculdade de Farmácia (UFMG) pela disponibilidade de realização dos testes ecotoxicológicos.

Ao Prof. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que gentilmente disponibilizou as cepas de cianobactérias para realização desse estudo.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- ABBAS, M. et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1295–1309, 2018.
- ABNT. NBR 15411-3: Ecotoxicology aquatic - Inhibitory effect on *Vibrio fischeri* bioluminescence. Part 3: Method using freeze-dried bacterias. **Brazilian Association of Technical Standards**, p. 1–27, 2021a.
- ABNT. NBR 16530: Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test method with *Artemia* sp

- (Crustacea, Brachiopoda). **Brazilian Association of Technical Standards**, p. 1–24, 2021b.
- AKKARI, A. C. S. et al. Pharmaceutical innovation: differences between Europe, USA and ‘pharmerging’ countries. **Gestao e Producao**, v. 23, n. 2, p. 365–380, 2016.
- AURE, M. A. et al. Short Communication A NEW PERSPECTIVE ON THE DUNNETT PROCEDURE : FILLING THE GAP BETWEEN NOEC / LOEC AND EC x CONCEPTS. v. 30, n. 12, p. 2888–2891, 2011.
- BARMSHURI, M.; KHOLDEBARIN, B.; SADEGHI, S. Applications of comet and MTT assays in studying Dunaliella algae species. **Algal Research**, n. 70:103018, 2023.
- BELDEN, J. Introduction to ecotoxicology. In: **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. [s.l.] INC, 2020. p. 381–393.
- BRASIL. **Viral Hepatitis Epidemiological Bulletin 2023**. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hepatites-virais/boletim-epidemiologico-hepatites-virais-_2023.pdf/view>. Acesso em: 1 mar. 2024a.
- BRASIL. **Health will double the number of hepatitis B patients being treated in Brazil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/julho/saude-vai-dobrar-o-numero-de-pacientes-com-hepatite-b-em-tratamento-no-brasil#:~:text=No caso da hepatite B,41 mil estão em tratamento.>>>. Acesso em: 18 jan. 2023b.
- CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P. R. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae. **Journal of Phycology**, v. 10, n. 2, p. 238–40, 1974.
- DONG, Y. et al. The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*. **Emerging Contaminants**, v. 5, p. 297–302, 2019.
- EGUCHI, K. et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, v. 57, n. 11, p. 1733–1738, 2004.
- ESCHER, M. A. DA S. et al. a Problemática Ambiental Da Contaminação Dos Recursos Hídricos Por Fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 51, p. 141–148, 2019.
- FUNED. **Package leaflet - Entecavir monohydrate** Belo Horizonte Ezequiel Dias Foundation, , 2023.
- GARCÍA, S. O.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; IRUSTA-MATA, R. Dose–response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 1, p. 141–162, 2016.
- GHEORGHE, S. et al. Risk screening of pharmaceutical compounds in Romanian aquatic environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 6, 2016.
- GOMAA, M. et al. Phycotoxicity of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs to green algae *Chlorella* sp. and *Desmodesmus spinosus*: Assessment of combined toxicity by Box–Behnken experimental design. **Environmental Technology and Innovation**, v. 23, p. 101586, 2021.
- ISO 11348-3. **Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria**. Switzerland: [s.n.].
- JAIN, S. et al. Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 2, p. 1410, 2013.
- JOHNSON, D. J. et al. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. **Ecotoxicology and**

Environmental Safety, v. 67, n. 1, p. 128–139, 2007.

KATZ, N. et al. Ivermectin efficacy against *Biomphalaria*, intermediate host snail vectors of Schistosomiasis. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 680–684, 2017.

KORNIS, G. E. M.; BRAGA, M. H.; DE PAULA, P. A. B. Recent transformations in the pharmaceutical industry: an examination of the global and Brazilian experience in the 21st century. **Physis**, v. 24, n. 3, p. 885–908, 2014.

LIU, W. et al. Trends in hepatitis B notification rates in Guangzhou, China, between 2009 and 2020: an epidemiological study. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2022.

LOMBA, L. et al. Ecotoxicological study of six drugs in *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 9, p. 9891–9900, 2020.

LORCA, G. et al. Assessing the Ecotoxicity of Eight Widely Used Antibiotics on River Microbial Communities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16960, p. 1–26, 2023.

MASZKOWSKA, J. et al. Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 1122–1126, 2014.

MINGUEZ, L. et al. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 6, p. 4992–5001, 2016.

NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 135398508, Entecavir**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>>. Acesso em: 27 set. 2022.

NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 2244, Aspirin**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aspirin>>. Acesso em: 27 jan. 2024a.

NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 156391, Naproxen**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naproxen>>. Acesso em: 27 jan. 2024b.

NCUBE, S. et al. **Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives** *Water Research* Elsevier Ltd, , 2018.

OECD. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Tests. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 2**, n. July, p. 4–7, 2006.

ORTIZ DE GARCÍA, S. A. et al. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1517–1533, 2014.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 265–268, 2006.

RASHED, M. N. ET AL. **Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Rijeka: IntechOpen, 2022.

REUSCHENBACH, P. et al. ECOSAR model performance with a large test set of industrial chemicals. **Chemosphere**, v. 71, n. 10, p. 1986–1995, 2008.

RITZ, C. et al. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

RIVA, F. et al. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 361, n. April 2018, p. 103–110, 2019.

RIVERO-WENDT, C. L. G. et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of

the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 605–615, 2014.

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, n. October, p. 225–232, 2017.

SAUDER, D. C.; DEMARS, C. E. An Updated Recommendation for Multiple Comparisons. **Advances in Methods and Practices in Psychological Science**, v. 2, n. 1, p. 26–44, 2019.

SILVA, S. R. et al. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10, n. 12, p. 1565–1577, 2019.

SIMS, K. A.; WOODLAND, A. M. Entecavir: A new nucleoside analog for the treatment of chronic hepatitis B infection. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 12 I, p. 1745–1757, 2006.

SOUZA-SILVA, G. et al. Toxicological evaluation of antiretroviral Tenofovir Disoproxil Fumarate on the mollusk *Biomphalaria glabrata* and its hemocytes. **Science of the Total Environment**, v. 891, n. March, 2023a.

SOUZA-SILVA, G. et al. Using freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) as a biological model for ecotoxicology studies: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 11, p. 28506–28524, 2023b.

TALLARICO, L. DE F. et al. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 208–215, 2014.

THOMAS, J. D.; NWANKO, D. I.; STERRY, P. R. The Feeding Strategies of Juvenile and Adult *Biomphalaria glabrata* (Say) under Simulated Natural Conditions and their Relevance to Ecological Theory and Snail Control. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 226, n. 1243, p. 177–209, 1985.

UNITED-NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. 10. ed. New York and Geneva: United Nations Publications, 2023.

VERMEIRSEN, L. M. et al. Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams – Unravelling the contribution of chemicals causing effects. p. 1–30, 2019.

VURM, R.; TAJNAIOVÁ, L.; KOFROŇOVÁ, J. The influence of herbicides to marine organisms *aliivibrio fischeri* and *artemia salina*. **Toxics**, v. 9, n. 11, p. 275, 2021.

WHO. **Hepatitis B**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>>. Acesso em: 23 dez. 2023.

WILKINSON, J. L. et al. Pharmaceutical pollution of the world ' s rivers. **Environmental Sciences**, v. 119, n. 8, p. 1–10, 2022.

YAMAGISHI, T. et al. Comparative genome analysis of test algal strain NIVA-CHL1 (*Raphidocelis subcapitata*) maintained in microalgal culture collections worldwide. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–14, 2020.

YAMANAKA, G. et al. Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 190–193, 1999.

YAO, L. et al. Development and validation of sensitive methods for simultaneous determination of 9 antiviral drugs in different various environmental matrices by UPLC-MS/MS. **Chemosphere**, v. 282, n. May, p. 131047, 2021.

9 CAPÍTULO 3 – REMOÇÃO DO ENTECAVIR POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO E POR AÇÃO DE CIANOBACTERIA

Cléssius R. de Souza^{1*}, Gabriel Souza Silva¹, Olívia M. S. R. Vasconcelos², Carolina Paula de Souza Moreira², Kenia Pedrosa Nunes³, Cíntia A. J. Pereira⁴, Marcos Paulo Gomes Mol², Micheline Rosa Silveira¹

1 – Departamento de Farmácia Social, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte/MG, Brasil.

2 – Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias – Belo Horizonte/MG, Brasil.

3 – Departamento de Engenharia Biomédica e Ciências – Instituto de Tecnologia da Flórida – Melbourne/FL, USA.

4 – Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte/MG, Brasil.

Submetido a revista *Toxics* em 17/10/2024. Situação: em revisão por pares.

Resumo

O entecavir (ETV) é um antiviral utilizado para o tratamento da infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B que afeta aproximadamente 250 milhões de pessoas no mundo. Para mitigar os impactos do ETV no meio ambiente incluindo possíveis danos à saúde humana, este trabalho avaliou a utilização da reação de Fenton-like, que utiliza ferro complexado ao ácido etilenodiaminoteracético (EDTA) com pH neutro, comparando à ação microbiológica da *Microcystis novacekii* na remoção do ETV presente no meio aquoso. As concentrações aquosas de 100 mg/L e variando entre 1,2 a 120 mg/L foram submetidas aos processos de degradação do Fenton-like e Biodegradação, respectivamente. Os resultados demonstraram efetividade consistente na remoção do ETV por meio do Fenton-like, sendo totalmente removido após 90 segundos de reação. No entanto, a biodegradação pela ação da *M. novacekii* não se demonstrou efetiva. Embora a exposição do entecavir não tenha afetado o crescimento celular da cianobactéria, houve pequeno decréscimo no teor do fármaco a partir do quarto dia de exposição, com remoção máxima de 28,9% na menor concentração de exposição (1,2 mg/L), sem, no entanto, apresentar uma diferença significativa. Somente após 14 dias de exposição, em algumas concentrações, houve diferenças estatisticamente significativas na remoção do fármaco. O processo de remoção do ETV por meio da reação de Fenton mostrou-se eficaz e

promissor para aplicação prática. A biodegradação por meio da *M. novacekii* não apresentou eficiência significativa para sua utilização direta na remoção do ETV em ambientes aquáticos. No entanto, houve uma pequena diminuição nas concentrações iniciais que, por meio de associações com outros microrganismos ou processos físico-químicos ou ainda por meio de engenharia genética, poderia alcançar maior eficiência na remoção do fármaco.

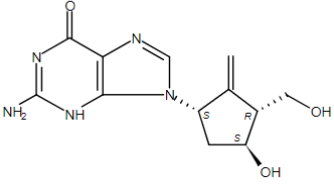
Palavras-chave: Entecavir, Fenton-like, Biodegradação, Cianobacteria, Microcystis

Introdução

O entecavir (ETV) é um dos fármacos indicados para o tratamento da infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B (SHAW; LOCARNINI, 2004; YAMANAKA et al., 1999). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) 254 milhões de pessoas viviam com hepatite B no mundo, em 2022, com 1,2 milhões de novas infecções por ano (WHO, 2024). No Brasil, no período de 2000 a 2022, foram diagnosticados 276.646 casos confirmados de hepatite B (BRASIL, 2023b).

O ETV é um antiviral análogo da 2-desoxiguanosina com atividade seletiva contra a polimerase de DNA do vírus da hepatite B (VHB), atuando como um inibidor da enzima transcriptase reversa nucleosídeo (ITRN). Sua maior atividade antiviral ocorre após fosforilação intracelular, gerando um metabólito ativo na forma de trifosfato que inibe todos os estágios das atividades enzimáticas para replicação viral inibindo: seletivamente a iniciação da polimerase do DNA-VHB, a transcrição reversa do DNA da cadeia negativa do RNA mensageiro e a síntese do DNA da cadeia positiva. As doses recomendadas são de 0,5mg/dia a 1,0 mg/dia para doença hepática compensada e doença hepática descompensada, respectivamente. Cerca de 68 a 73% do fármaco é eliminado na forma inalterada pelos rins, sendo a depuração renal independente da dose, sugerindo que o ETV passa tanto por filtração glomerular quanto por secreção da rede tubular (SIMS; WOODLAND, 2006). Os valores de pKa e Log Kow sugerem que o ETV persiste no meio ambiente na forma não ionizada e de difícil absorção pelas camadas lipídicas dos compartimentos, conforme Tabela 1 (NCBI, 2022).

Tabela 1 – Identificação e propriedades físico-químicas do entecavir

Número CAS	Estrutura molecular	Peso molecular	Fórmula química	pKa	Log _{K_{ow}}
142217-69-4		277,28 g/mol	C ₁₂ H ₁₅ N ₅ O ₃	8,0	-0,8

Com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico, houve um aumento exponencial no número de novos fármacos e nas quantidades produzidas em todo o mundo (AKKARI et al., 2016; KORNIS; BRAGA; DE PAULA, 2014). Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos orgânicos resistentes à degradação ambiental por meio de processos biológicos, químicos e fotolíticos gerando toxicidade (RASHED, 2022). Resíduos de processos produtivos da indústria química e farmacêutica, medicamentos descartados de forma inadequada e os seus metabólitos associados ao consumo são exemplo de POPs (JAIN et al., 2013; NCUBE et al., 2018; RASHED, 2022).

Os Processos Oxidativo Avançados (POAs), tem se destacados como uma alternativa adicional aos processos biológicos de tratamento convencionais de efluentes que utilizam em sua maioria sistema de reator anaeróbico de fluxo ascendente (RAFA), sistema de lodos ativados ou sistema aeróbico de lagoas, esse último necessitando de grandes extensões e tempo considerável para a degradação dos compostos pela ação de microrganismos (GHERNAOUT; ELBOUGHDIRI; GHAREBA, 2020; VORONTSOV, 2019). A reação de Fenton e o processo de Foto-Fenton promovem a degradação química de diversas substâncias por meio da geração e ação de radicais hidroxila (HO•). Esse radical possui potencial de oxidação elevado, da ordem de +2,8 V, superior aos dos oxidantes convencionais e menor apenas para o potencial de oxidação do flúor (+ 3,03 V) (PARSONS, 2005).

Alternativamente ao processo tradicional de Fenton, a adição de EDTA no sistema possibilita realizar a oxidação dos compostos em pH neutro, leva a um consumo mais eficiente de H₂O₂, maior decomposição de H₂O₂ catalisada por ferro em radicais hidroxila (HO•), consequentemente, uma melhor remoção dos compostos orgânicos da amostra (MESSELE et al., 2019). Além disso, em virtude do pH neutro, processos biológicos adicionais podem ser

utilizados para degradabilidade final das substâncias (KAZIMIEROWICZ; DEBOWSKI; ZIELIŃSKI, 2023; MONSALVO et al., 2015).

Outra alternativa de tratamento de efluentes são métodos que utilizam cianobactérias, que se apresentam como grande potencial para sistemas de biodegradação em estudo ecotoxicológicos (TOULIABAH et al., 2022). Estes microrganismos têm ampla distribuição e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência (MUSTAFA et al., 2021). As cianobactérias possuem um papel importante para a redução de poluentes orgânicos no ambiente, seja por mecanismos de bioacumulação, biodegradação ou outros mecanismos. Estes microrganismos ocupam a base da cadeia alimentar, e podem degradar os poluentes presentes no meio, incluindo fármacos, como por exemplo, na biodegradação da carbamazepina (UMMALYMA; PANDEY; SUKUMARAN, 2017; WANG et al., 2020), da tetraciclina (PAN et al., 2021), da clortetraciclina e oxitetraciclina (ZHOU et al., 2021), do inseticida piridafention (HAMED et al., 2021) e efluentes farmacêuticos (LAKHANI et al., 2022; OLIVEIRA SANTOS; OLIVEIRA DE SOUZA; MARCELINO, 2023).

Devido a sua importância nos ecossistemas, sua capacidade de bioacumulação e degradação de poluentes, além de ser um importante indicador de poluição de meios aquáticos, a *Microcystis novacekii* têm potencial para a avaliação consistente dos níveis de poluição de diferentes substâncias e de uso estruturado em estações de tratamento de efluentes (CAMPOS et al., 2013; FIORAVANTE et al., 2010; XIAO; LI; REYNOLDS, 2018). Estudos mostram a capacidade de degradação de fármacos e agrotóxicos presentes no meio aquático pela ação de algas do gênero *Microcystis* sp sem a geração de metabólitos ativos ou tóxicos (CAMPOS et al., 2013; FIORAVANTE et al., 2010, 2012; SILVA et al., 2019).

Considerando a possível presença do entecavir no ambiente aquático, um antiviral que interfere diretamente em processos enzimáticos e na síntese de proteínas, com possíveis impactos no meio ambiente e na saúde humana, e a expressiva taxa de excreção do fármaco na forma inalterada, visou-se com a presente pesquisa avaliar a degradação química do entecavir pelo processo oxidativo avançado de Fenton e a biodegradação microbiológica pela ação da cianobactéria *Microscystis novacekii*.

Metodologia

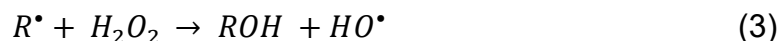
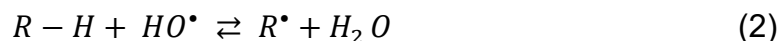
Insumos e equipamentos para quantificação do ETV

O fármaco ETV, com 99,88% de pureza, foi analisado e disponibilizado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) atendendo a todos os requisitos de qualidade especificados pela farmacopeia americana. As soluções para os testes de degradação química foram preparadas com água Milli-Q altamente pura a uma concentração inicial de 100 mg/L. O monitoramento da concentração foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em Cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-2060C 3D, utilizando coluna de fase reversa Discovery® HS C18 (250x4,6 mm; 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, com varredura de 190 a 800 nm, temperatura de 30°C e volume de injeção de 10 µL. A eluição foi realizada com 20% de acetonitrila grau HPLC em água, ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico por 10 minutos. Para a quantificação foi preparada curva de calibração com padrão primário de ETV fornecido pela Farmacopeia Europeia e os dados processados por meio do software LabSolutions instalado no equipamento. Outras substâncias como H₂O₂ 30v, FeSO₄•7H₂O e Na₂-EDTA para o desenvolvimento da reação, foram adquiridos com grau de pureza adequada para análise.

Remoção com reagente de Fenton

A solução do complexo Fe-EDTA a 1 mol/L foi previamente preparada em meio aquoso e pH próximo a neutralidade. A reação de Fenton foi realizada em um béquer de vidro de 250 mL, sob agitação magnética constante, em temperatura ambiente e pH ajustado para $7,0 \pm 0,5$. Foram adicionados ao béquer 100 mL da solução de ETV 100 mg/L, 10 mL de solução FE-EDTA 1 mol/L. Para início da reação foi adicionado 3,8 mL de H₂O₂ 30 V. Foram coletadas amostras de 1 mL nos tempos 0; 5; 40; 90; 180; 300; 600; 900; 1.200; 1.500; 1.800; 3.600; 5.400 e 7.200 segundos, as quais foram individualmente neutralizadas com 8,7 mg de Na₂SO₃. O teste foi realizado em triplicata.

Na presença da matéria orgânica, as reações com o reagente de Fenton podem ocorrer por meio de um mecanismo de reação em cadeia na qual a etapa limitante é a formação de radicais hidroxila, nesse caso o consumo de H₂O₂, conforme Eq. 1 a 6 (LIN; LO, 1997; MERZ; WATERS, 1949).



Biodegradação com *Microcystis novacekii*

Foram utilizadas soluções de ETV cujas concentrações não apresentaram toxicidade para as cianobactérias em teste ecotoxicológico previamente realizado conforme guia OCDE 201. As soluções de ETV para os testes de biodegradação foram preparadas em meio de cultura ASM-1 (CARMICHAEL; GORHAM, 1974) no Laboratório de Saúde Pública/Água da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (LASPA-FAFAR). Foi preparada uma solução estoque de ETV de 240 mg/L em meio ASM-1. Para o preparo, o fármaco foi adicionado ao meio de cultura sob agitação constante até completa solubilização. Volumes específicos da solução estoque de ETV e meio de cultura ASM-1 foram adicionados em erlenmeyers para volume total de 100 mL, atingindo as concentrações de 120, 60, 24, 12 e 1,2 mg/L. As amostras foram incubadas sob agitação, com temperatura controlada de (23 ± 2) °C, com fotoperíodo de 12 horas e as amostragens realizadas nos tempos 0, 4, 7, 14, 21 e 30 dias de incubação. Após cada amostragem, o crescimento celular foi avaliado por meio de espectrofotometria visível, a 680 nm. Foi utilizado espectrofotômetro Merck, modelo Spectroquant® Prove 100. A curva de crescimento da cepa, descrita na equação 7, foi previamente elaborada LASPA-FAFAR. As amostras foram também filtradas em membrana de éster de celulose de 0,22 µm e encaminhadas para quantificação do ETV. A quantificação do ETV foi realizada conforme descrito no item anterior por CLAE. O teste foi realizado em triplicata sendo a eficiência do processo determinado por meio da equação 8.

$$Y = 10^7 x - 10^6 \quad (r^2 = 0,9963) \quad (7)$$

Onde Y é a quantidade de células presente no meio e x é a absorbância determinada na amostra.

$$E = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \cdot 100 \quad (8)$$

Onde E é a eficiência do processo em porcentagem, Ci é a concentração inicial e Cf a concentração final de ETV na amostra.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R, versão 4.2.2, utilizando os testes Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados, teste não paramétrico de Wilcoxon, Kruskal-Wallis e post-hoc de Games Howell (RITZ et al., 2015; SAUDER; DEMARS, 2019).

Resultados e discussão

Remoção pela reação de Fenton

O ETV sofreu uma rápida remoção logo após o início da reação de Fenton-like. Observa-se nos resultados que a partir de 90 segundos o ETV não é mais detectado (Figura 1; Tabela 2). Não foram observadas alterações significativas no pH. O pH inicial foi de 6,8 e, ao final do processo, o pH foi de 7,2, mantendo-se próximo ao valor de neutralidade.

Figura 1: Remoção do entecavir por meio do reagente de Fenton-like

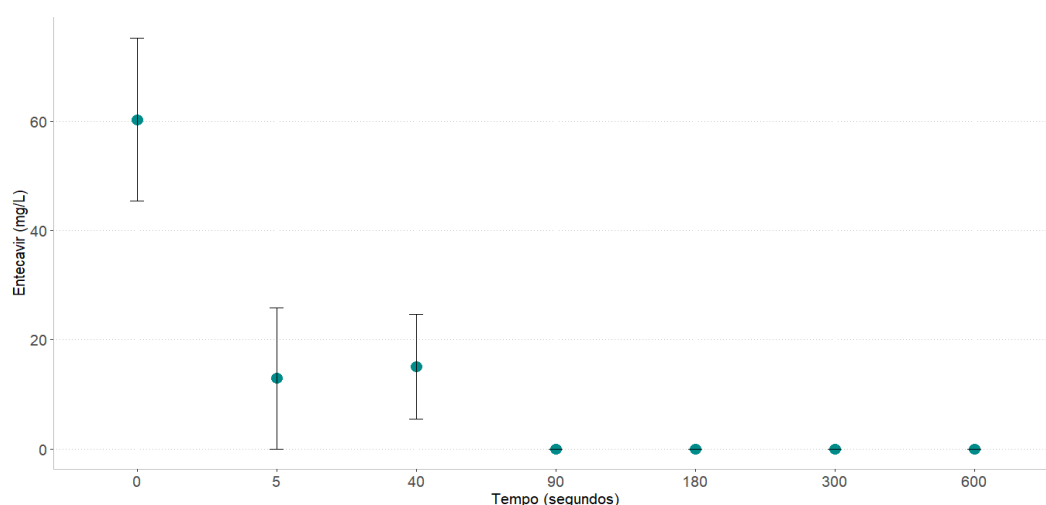
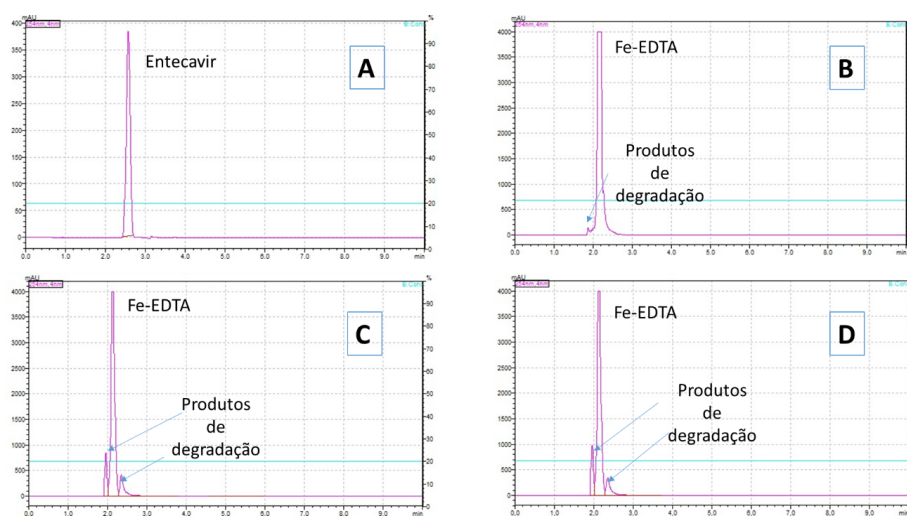


Tabela 2: Eficiência de remoção do entecavir por meio da reação de Fenton-like de 0 a 10 minutos

Tempo (segundos)	Concentração Mediana (EP)	Eficiência (%)	p-valor
0	60.3 (35.2)	-	-
5	12.9 (19.4)	78,6	0,07
40	15.1 (16.4)	75,0	0,14
90	0	100,0	< 0,05
180	0	100,0	< 0,05
300	0	100,0	< 0,05
600	0	100,0	< 0,05

Foi possível observar eficiência de 100% após 90 segundos de exposição ao reagente de Fenton-like. Um resultado promissor do ponto de vista prático. No entanto, não foi possível afirmar que o ETV tenha sido completamente mineralizado, haja vista que outros picos foram detectados no cromatograma indicando a ocorrência de subprodutos (Figura 2). Embora o EDTA seja uma molécula de difícil degradação, em virtude da presença do EDTA na matriz, é possível que parte dos subprodutos identificados no cromatograma sejam provenientes tanto do ETV quanto do EDTA. Estudos de degradação do EDTA por Fenton mostram reduções pequenas a moderadas em pH neutro e mais efetivas em pH ácido e na presença de luz ultravioleta (GHISELLI et al., 2004; HUA; HUANG, 2020; MESSELE et al., 2019; XU et al., 2018).

Figura 2: Cromatogramas da remoção do entecavir por meio do reagente de Fenton-like em diferentes tempos de reação



Tempo de reação: A-Tempo zero (Sem adição de Fe-EDTA); B-90 segundos; C-300 segundos; D-600 segundos

A remoção do ETV é consistente com alguns estudos que utilizaram a reação de Fenton ou Fenton-like com uso de ferro complexado ao algum ácido carboxílico. Em estudo utilizando um efluente de uma estação de tratamento de esgoto foram identificadas diversas substâncias com atividade farmacológica, que foram submetidos a processo de degradação por Fenton por 3.600 segundos (60 minutos). Os resultados também foram significativos. Os fármacos com suas respectivas concentrações iniciais no efluente, citalopram 93 ng/L, codeína 37 ng/L, tramadol 853 ng/L e venlafaxina 371 ng/L, após a reação de Fenton-like passaram a concentrações de <4,4 ng/L, <5,5 ng/L, <3,7 ng/L e <3,7 ng/L respectivamente, removendo de 90 a 99% dos medicamentos do efluente e de 76 a 99% das drogas ilícitas (MACKULAK et al., 2015). Outro estudo demonstrou que dipirona, um anti-inflamatório largamente utilizado na América Latina, alcançou taxas de remoção de 94,1% em 45 minutos (GIRI; GOLDBER, 2014). Com uso específico do complexo Fe-EDTA, Messele *et al.* (2019) apresentou resultado promissor de degradação do fenol. Após 30 min de reação, 85% da substância foi convertida a ácidos orgânicos de cadeia curta e após 60 minutos, 96% foram convertidos aos mesmos ácidos. Em outro estudo com uso do complexo Fe-EDTA foi demonstrada a degradação de 100%, em 90 minutos, do corante orgânico verde malaquita, substância aromática, policíclica, altamente tóxica utilizada na indústria de celulose, têxtil e como antimicrobiano na piscicultura (HU et al., 2018).

Observa-se que a concentração utilizada para o fármaco ETV foi significativamente menor quando comparada com as concentrações estudadas para a degradação do verde malaquita e do fenol. Em geral, busca-se avaliar processos de degradação que atendam as concentrações ambientalmente relevantes, seja pela ocorrência real nos efluentes e corpos d'água, seja pelo critério estabelecido pela *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* – GHS, a qual definiu que, amostras com CE_{50} acima de 100 mg/L são considerados não tóxicos para ecossistemas aquáticos (UNITED-NATIONS, 2023). Sendo assim, as diferenças no tempo necessário para degradação significativa das substâncias ETV (90 segundos), fenol (3.600 segundos) e verde malaquita (5.400 segundos), estão relacionadas diretamente as concentrações iniciais submetidas ao reagente de Fenton, e possivelmente as respectivas estruturas moleculares.

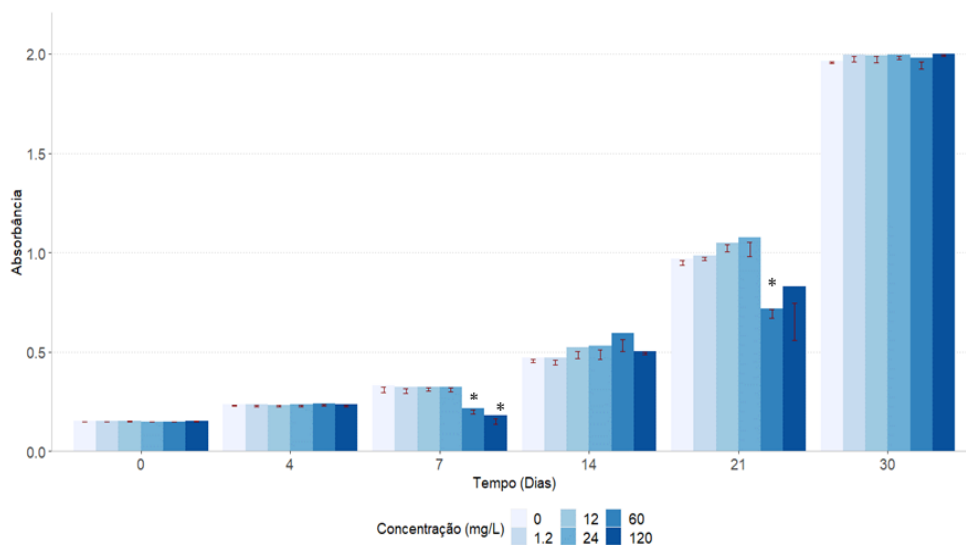
Todos esses resultados convergem para o ponto crucial do uso de complexo Fe-EDTA, a vantagem do uso de menores concentrações devido a regeneração do Fe^{2+} e Fe^{3+} , a

possibilidade da total mineralização das substâncias, a execução do processo em pH próximo da neutralidade e a menor taxa de precipitação do Fe^{2+} , o que, em escala real, diminuiria os custos de operação e descarte do efluente tratado no meio ambiente. Porém, o processo apresenta a desvantagem da liberação de EDTA para meio-ambiente, a reação dos radicais hidroxilas com o próprio EDTA, desestabilizando o complexo e diminuindo a velocidade da reação (DUO et al., 2019; MESSELE et al., 2019). Apesar da possível liberação do EDTA para o meio ambiente, não há consenso sobre sua toxicidade ambiental, embora a maioria dos autores apontem para sua baixa toxicidade. Atualmente o EDTA é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, cosmética, agrícola e na remediação de contaminantes metálicos no meio ambiente (HU et al., 2018; OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003; PASCUAL et al., 2020; ZHANG; ZHOU, 2019).

Degradação microbiológica pela ação da cianobactéria *Microcystis novacekii*

A exposição crônica da *M. novacekii* ao ETV (Figura 3) não afetou o seu crescimento celular quando comparado com o controle negativo. Mesmo nos períodos de sete e 21 dias, onde foram verificados um decréscimo no crescimento celular em algumas concentrações, a cultura recuperou completamente a capacidade de reprodução no período subsequente. Para todos os demais períodos avaliados não houve diferenças significativas ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem que o ETV não foi utilizado como substrato que pudesse fornecer nutrientes capazes de propiciar um crescimento celular diferenciado e que não houve interferência na taxa de crescimento, ou seja, não houve toxicidade para o organismo.

Figura 3: Curva de crescimento de *Microcystis novacekii* expostas ao entecavir em diferentes concentrações



* Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Em todas as concentrações de ETV submetidas a ação da *M. novacekii* houve pequeno decréscimo no teor do fármaco a partir do quarto dia de exposição, com remoção máxima de 28,9% na menor concentração de exposição (1,2 mg/L), sem, no entanto, apresentar uma diferença significativa (Figura 4; Tabela 3).

Figura 4: Remoção do entecavir em diferentes concentrações pela ação da *Microcystis novacekii*, expressas pelas medianas e erros padrões.

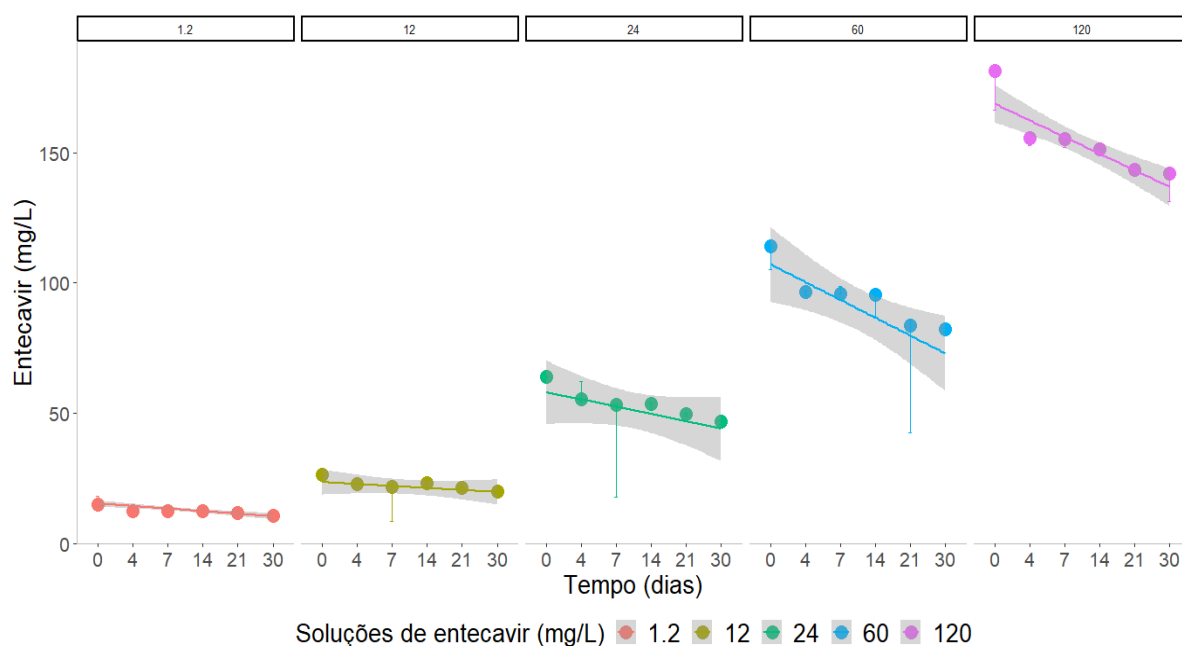


Tabela 3: Eficiência de remoção de entecavir pela *Microcystis novacekii* no período de 4 a 30 dias de exposição

Exposição (mg/L)	% Eficiência (EP)				
	Tempo (Dias)				
	4	7	14	21	30
1.2	17.1 (0.9)	17.8 (0.4)	17.8 (0.2)	23.0 (0.3)	28.9 (0.3)
12	13.6 (0.1)	18.1 (10.2)	12.5 (2.6)	19.2 (0.4)*	24.5 (0.6)*
24	13.7 (6.4)	16.8 (27.0)	16.1 (2.1)*	22.5 (0.8)*	22.8 (1.2)*
60	15.4 (1.6)	16.0 (2.0)	16.2 (6.7)	26.7 (33.6)	28.0 (1.2)
120	14.4 (4.0)	14.4 (2.5)	16.6 (3.6)	48.7 (70.0)	21.5 (9.0)

EP: Erro padrão; * Diferenças estatisticamente significativas em relação a concentração inicial de entecavir ($p < 0.05$)

Somente após 14 dias de exposição em algumas concentrações houve diferenças estatisticamente significativas na remoção do fármaco, porém sem aplicabilidade prática para o tratamento de efluente ou da água. Na prática, para o tratamento aeróbico de esgoto e água o tempo de detenção hidráulica, ou seja, o tempo médio que a massa hidráulica fica dentro de um tanque, deve variar de 5 a 10 dias (VON SPERLING, 2007). A biodegradação é dependente da espécie e das características da molécula do xebonitótico como lipossolubilidade, do transporte pela membrana celular e do crescimento celular. Por exemplo, em quatro dias, culturas de *M. novacekii* removeram 26,06% de atrazina (50 µg/L), 73,18% α-etinilestradiol (0,15mg/L) e após cinco dias 58,7% de metilparation (1 mg/L) (FIORAVANTE et al., 2010, 2012; PAN et al., 2021).

As colônias de cianobactérias têm como características a capacidade de consumir o carbono inorgânico causando a elevação do pH a níveis alcalinos (próximo de 9) das águas superficiais (LE et al., 2022; LI et al., 2022). Em geral, os xenobióticos estão presentes em matrizes ambientais eutrofizadas com nitrogênio e fósforo. Para as *Microcystis*, o enriquecimento do meio com N promove colônias maiores e com P menores. Nessas condições o P não é considerado um promotor de crescimento de colônias de *Microcystis* (LE et al., 2022). A molécula de ETV possui 5 átomos de N que poderiam ser degradados a amônia (NH₃) o que corroboraria ainda mais para a elevação do pH, com consequente hidrólise do ETV presente no meio (DALMORA et al., 2010; MALIPATIL; BHARATH; DIPALI, 2012). Essa alteração no pH poderia promover uma vantagem competitiva ao organismo, favorecendo seu crescimento (LE et al., 2022). O aumento do pH não foi observado durante o período de exposição, variando de 5,5 a 7, sugerindo o que o carbono presente na molécula do ETV não foi completamente metabolizado a formas inorgânicas nem o nitrogênio completamente metabolizado a amônia. É possível que a estreita alteração do pH esteja atribuída a presença do ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) presente no meio de cultura, que poderia estar atuando como agente

tamponante. Outra possibilidade seria o crescimento celular mixotrófico, diminuindo assim o consumo do carbono inorgânico (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013).

As baixas taxas de remoção podem estar relacionadas as características hidrofílicas do ETV ($\text{LogK}_{\text{OW}} = -0,8$). Nos estudos de BAI; ACHARYA (2016), foi demonstrado que a molécula hidrofóbica como triclosan ($\text{LogK}_{\text{OW}} = 4,76$) foi melhor degradada pela alga verde *Nannochoris sp* quando comparadas com as moléculas de sulfametoxazol ($\text{LogK}_{\text{OW}} = 0,89$) e trimetoprim ($\text{LogK}_{\text{OW}} = 0,91$), alcançando 100% de remoção após sete dias de exposição (BAI; ACHARYA, 2016). Considerando ainda os possíveis mecanismos de biodegradação que envolvem a adsorção, absorção, metabolização e conjugação, xenobióticos mais lipossolúveis (hidrofóbicos) teriam maior facilidade de transporte para o interior das cianobactérias, facilitando o processo de biodegradação por ações enzimáticas (XIONG et al., 2021).

Embora as taxas de biodegradação sejam relativamente baixas, o fato de haver um mínimo de biodegradação, possibilita o desenvolvimento de novas pesquisas que busquem melhorar a eficiência do processo. A *M. novacekii* não realiza a fixação de nitrogênio (N_2) da atmosfera, realizando a redução do nitrogênio preferencialmente de fontes inorgânicas como o íon amônio (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-). A associação a outros organismos ou acoplamento de processos físico químicos, como Fenton like ou foto Fenton, e biológicos poderia auxiliar na conversão do N_2 a forma nitrogenadas que facilitaria o metabolismo celular (HARKE et al., 2016; LE et al., 2022; XIONG et al., 2021). A simbiose entre bactérias e cianobactérias pode ocorrer com a metabolização do xenobióticos pela bactéria fornecendo nitrogênio, fósforo e carbono inorgânico assimiláveis pelas cianobactérias. Em contrapartida as cianobactérias fornecem oxigênio, carboidratos e vitaminas, sobretudo vitaminas do complexo B, essenciais a sobrevivência da bactéria potencializando a degradação dos xenobióticos (MUTALIPASSI et al., 2021).

As cianobactérias têm o potencial de responder eficazmente a diversos poluentes orgânicos, incluindo fármacos, utilizando mecanismos de bioacumulação e biodegradação (PAN et al., 2021; SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013). Moléculas mais complexas que o ETV como os fármacos amoxicilina, sulfametoxazol, tetraciclina, tenofovir, carbamazepina e o inseticida malation foram eficientemente removidos do meio pela ação de cianobactérias, incluindo a *M. novacekii* (NIE et al., 2020; PAN et al., 2021; SILVA et al., 2022; WANG et al., 2020). Para moléculas com baixo percentual de remoção do meio, a associação com outros organismos pode facilitar sua degradabilidade, como demonstrado em outros estudos, substâncias recalcitrantes e tóxicas foram removidas com eficiência utilizando associação de

organismos como bactérias, algas, cianobactérias e macrófitas (ABED, 2010; FANG et al., 2024; REMPEL et al., 2021; ZYMANCZYK-DUDA et al., 2022). Esse pode ser o caminho para o processo de biorremediação do ETV com a *M. novacekii*. No entanto, o potencial de degradação da cianobactéria *M. novacekii* em ambientes não controlados pode trazer riscos como a produção de toxinas capazes de prejudicar significativamente os corpos d'água superficiais, com destaque para as microcistinas. Assim, a utilização de um consórcio de organismos, principalmente outras bactérias com capacidade de degradação dessas moléculas, poderiam auxiliar no controle ou diminuição das concentrações de microcistinas no ambiente aquático (HE et al., 2022).

Conclusão

O processo de remoção do ETV por meio da reação de Fenton mostrou-se eficaz e promissor para aplicação prática. O tempo de exposição de 1,5 minutos foi suficiente para redução da concentração de ETV de 300 mg/L a concentração indetectável. É possível que o ETV não tenha sido totalmente mineralizado, gerando subprodutos cuja toxicidade é desconhecida, porém a desestruturação da molécula do ETV mitiga os riscos de desenvolvimento de resistência ao antiviral em microrganismos e vírus.

A biodegradação por meio da *M. novacekii* não apresentou resultados contundentes para sua utilização direta na remediação do ETV em ambientes aquáticos. Houve uma pequena diminuição nas concentrações iniciais que poderia, por meio de associações com outros microrganismos ou processos físico-químicos ou ainda por meio de engenharia genética, alcançar maior eficiência na degradação do fármaco.

A falta de dados referente as concentrações de ETV no meio ambiente e os resultados obtidos nesse estudo, sobretudo em relação a biodegradação, traz um alerta para possível acumulação desse antiviral no meio ambiente com possibilidade real de desenvolvimento de cepas resistentes. Futuros estudos envolvendo matrizes complexas e associações de organismos e processos devem ser encorajados, principalmente para xenobióticos com potencial terapêutico, potencialmente tóxicos e hidrofílicos como o ETV.

Agradecimentos

A FAPEMIG, processo APQ-02426-21, pelo apoio para o desenvolvimento da pesquisa, aos Laboratórios de Ecotoxicologia da FUNED, da Faculdade de Engenharia Sanitária e Ambiental (UFMG) e do Laboratório de Saúde Pública /Água da Faculdade de Farmácia (UFMG) pela disponibilidade de realização dos testes ecotoxicológicos. Ao Prof. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que gentilmente disponibilizou as cepas de cianobactérias para realização desse estudo.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- ABED, R. M. M. International Biodeterioration & Biodegradation Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 58–64, 2010.
- AKKARI, A. C. S. et al. Pharmaceutical innovation: differences between Europe, USA and ‘pharmerging’ countries. **Gestao e Producao**, v. 23, n. 2, p. 365–380, 2016.
- BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochloris* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 315, p. 70–75, 2016.
- BRASIL. **Viral Hepatitis Epidemiological Bulletin 2023**. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hepatites-virais/boletim-epidemiologico-hepatites-virais_-2023.pdf/view>. Acesso em: 1 mar. 2024.
- CAMPOS, M. M. C. et al. Evaluation of the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* to remove atrazine from a culture medium Evaluation of the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* to remove atrazine from a culture medium. **Journal of Environmental Science and Health , Part B**, v. 48, n. 2, p. 101–107, 2013.
- CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P. R. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic blue-green algae. **Journal of Phycology**, v. 10, n. 2, p. 238–40, 1974.
- DALMORA, S. L. et al. Determination of Entecavir in Tablet Dosage Form. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 2, p. 523–530, 2010.
- DUO, L. et al. Chemosphere Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* to EDTA addition under turfgrass growing conditions. **Chemosphere**, v. 220, p. 56–60, 2019.
- FANG, Y. et al. Advanced treatment of antibiotic-polluted wastewater by a consortium composed of bacteria and mixed cyanobacteria ☆. **Environmental Pollution**, v. 344, n. January, p. 123293, 2024.
- FIORAVANTE, I. A. et al. Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, n. 6, p.

1302–1306, 2010.

FIORAVANTE, I. A. et al. cyanobacteria *Microcystis novacekii*. **Journal os Environmental Monitiring**, v. 14, p. 2362–2366, 2012.

GHERNAOUT, D.; ELBOUGHDIRI, N.; GHAREBA, S. Fenton Technology for Wastewater Treatment: Dares and Trends. **OALib**, v. 07, n. 01, p. 1–26, 2020.

GHISELLI, G. et al. Destruction of EDTA using Fenton and photo-Fenton-like reactions under UV-A irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 167, n. 1, p. 59–67, 2004.

GIRI, A. S.; GOLDBERGER, A. K. Fenton, photo-fenton, H₂O₂ Photolysis, and TiO₂ Photocatalysis for Dipyrone Oxidation: Drug Removal, Mineralization, Biodegradability, and Degradation Mechanism. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 4, p. 1351–1358, 2014.

HAMED, S. M. et al. Dissipation of pyridaphenthion by cyanobacteria: Insights into cellular degradation, detoxification and metabolic regulation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, n. May 2020, p. 123787, 2021.

HARKE, M. J. et al. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, v. 54, p. 4–20, 2016.

HE, Q. et al. Microcystins in Water: Detection, Microbial Degradation Strategies, and Mechanisms. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 20, 2022.

HU, Y. et al. EDTA-Fe (III) Fenton-like oxidation for the degradation of malachite green. v. 226, n. June, p. 256–263, 2018.

HUA, J.; HUANG, M. Heterogeneous Fenton-like degradation of EDTA in an aqueous solution with enhanced COD removal under neutral pH. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 11, p. 2432–2440, 2020.

JAIN, S. et al. Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 2, p. 1410, 2013.

KAZIMIEROWICZ, J.; DEBOWSKI, M.; ZIELIŃSKI, M. Effect of Pharmaceutical Sludge Pre-Treatment with Fenton/Fenton-like Reagents on Toxicity and Anaerobic Digestion Efficiency. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 1, 2023.

KORNIS, G. E. M.; BRAGA, M. H.; DE PAULA, P. A. B. Recent transformations in the pharmaceutical industry: an examination of the global and Brazilian experience in the 21st century. **Physis**, v. 24, n. 3, p. 885–908, 2014.

LAKHANI, S. et al. A comprehensive study of bioremediation for pharmaceutical wastewater treatment. **Cleaner Chemical Engineering**, v. 4, n. September, p. 100073, 2022.

LE, V. VAN et al. *Microcystis* colony formation: Extracellular polymeric substance, associated microorganisms, and its application. **Bioresource Technology**, v. 360, n. July, 2022.

LI, S. et al. Algae-mediated antibiotic wastewater treatment: A critical review. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 9, p. 100145, 2022.

LIN, S. H.; LO, C. C. Fenton process for treatment of desizing wastewater. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2050–2056, 1997.

MACKULAK, T. et al. Fenton-like reaction: A possible way to efficiently remove illicit

drugs and pharmaceuticals from wastewater. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 483–488, 2015.

MALIPATIL, S. M.; BHARATH, S. A.; DIPALI, M. Pharma Science Monitor. **Pharma Science Monitor - An International Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 3, p. 2085–2104, 2012.

MERZ, J. H.; WATERS, W. A. The oxidation of aromatic compounds by means of the free hydroxyl radical. **Journal of Chemical Society**, p. 2427–2433, 1949.

MESSELE, S. A. et al. Enhanced degradation of phenol by a fenton-like system (Fe/EDTA/h₂o₂) at circumneutral pH. **Catalysts**, v. 9, n. 5, 2019.

MONSALVO, V. M. et al. Application of Fenton-like oxidation as pre-treatment for carbamazepine biodegradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 856–862, 2015.

MUSTAFA, S. et al. Journal of Water Process Engineering Microalgae biosorption , bioaccumulation and biodegradation efficiency for the remediation of wastewater and carbon dioxide mitigation : Prospects , challenges and opportunities. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, n. March, p. 102009, 2021.

MUTALIPASSI, M. et al. Symbioses of cyanobacteria in marine environments: Ecological insights and biotechnological perspectives. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 1–29, 2021.

NCBI. **PubChem Compound Summary for CID 135398508, Entecavir**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>>. Acesso em: 27 set. 2022.

NCUBE, S. et al. **Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives** *Water Research* Elsevier Ltd, , 2018.

NIE, J. et al. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research. **Science of the Total Environment**, v. 707, p. 136080, 2020.

OLIVEIRA SANTOS, M. DE J.; OLIVEIRA DE SOUZA, C.; MARCELINO, H. R. Blue technology for a sustainable pharmaceutical industry: Microalgae for bioremediation and pharmaceutical production. **Algal Research**, v. 69, n. September 2022, p. 102931, 2023.

OVIEDO, C.; RODRÍGUEZ, J. EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 901–905, 2003.

PAN, M. et al. Mitigating antibiotic pollution using cyanobacteria: Removal efficiency, pathways and metabolism. **Water Research**, v. 190, 2021.

PARSONS, S. **Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment**. London: IWA Publishing, 2005.

PASCUAL, G. et al. Effects of chemical interaction of nutrients and EDTA on metals toxicity to *Pseudokirckneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, n. July, p. 110966, 2020.

RASHED, M. N. ET AL. **Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Rijeka: IntechOpen, 2022.

REMPEL, A. et al. Science of the Total Environment Current advances in microalgae-based bioremediation and other technologies for emerging contaminants treatment. **Science of the Total Environment**, v. 772, p. 144918, 2021.

RITZ, C. et al. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

SAUDER, D. C.; DEMARS, C. E. An Updated Recommendation for Multiple Comparisons. **Advances in Methods and Practices in Psychological Science**, v. 2, n. 1, p. 26–44, 2019.

- SHAW, T.; LOCARNINI, S. Entecavir for the treatment of chronic hepatitis B. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, n. 6, p. 853–871, 2004.
- SILVA, S. et al. Biodegradation of the antiviral tenofovir disoproxil by a cyanobacteria / bacteria culture . **Research Square**, p. 1–18, 2022.
- SILVA, S. R. et al. Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10, n. 12, p. 1565–1577, 2019.
- SIMS, K. A.; WOODLAND, A. M. Entecavir: A new nucleoside analog for the treatment of chronic hepatitis B infection. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 12 I, p. 1745–1757, 2006.
- SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. **Environment International**, v. 51, p. 59–72, 2013.
- TOULIABAH, H. E. S. et al. A Review of Microalgae-and Cyanobacteria-Based Biodegradation of Organic Pollutants. **Molecules**, v. 27, n. 3, 2022.
- UMMALYMA, S. B.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Bioremediation by Microalgae : Current and Emerging Trends for Effluents Treatments for Value Addition of Waste Streams. In: **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**. Singapore: Springer, 2017. p. 355–375.
- UNITED-NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)**. 10. ed. New York and Geneva: United Nations Publications, 2023.
- VON SPERLING, M. **Biological Wastewater Treatment Series - Waste Stabilisation Ponds**. London: IWA, 2007.
- VORONTSOV, A. V. Advancing Fenton and photo-Fenton water treatment through the catalyst design. **Journal of Hazardous Materials**, p. 103–112, 2019.
- WANG, Q. et al. Carbamazepine toxicity and its co-metabolic removal by the cyanobacteria *Spirulina platensis*. **Science of the Total Environment**, v. 706, n. 83, p. 135686, 2020.
- WHO. **Global hepatitis report 2024: Action for access in low- and middle-income countries**. Geneva: World Health Organization, Department of Global HIV, Hepatitis and Sexually Transmitted Infections Programmes, 2024.
- XIAO, M.; LI, M.; REYNOLDS, C. S. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. **Biological Reviews**, v. 93, n. September, p. 1399–1420, 2018.
- XIONG, Q. et al. Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. **Environment International**, v. 155, p. 106594, 2021.
- XU, R. et al. Simultaneous Removal of Thallium and EDTA by Fenton Process. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 111, n. 1, 2018.
- YAMANAKA, G. et al. Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 190–193, 1999.
- ZHANG, Y.; ZHOU, M. A critical review of the application of chelating agents to enable Fenton and Fenton-like reactions at high pH values. **Journal of Hazardous Materials**, v. 362, p. 436–450, 2019.
- ZHOU, T. et al. Effect of chlortetracycline on the growth and intracellular components of *Spirulina platensis* and its biodegradation pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 413, n. October 2020, p. 125310, 2021.

ZYMANCZYK-DUDA, E. et al. Versatile Applications of Cyanobacteria in Biotechnology. **Microorganisms**, n. 10, p. 2318, 2022.

10 CAPÍTULO 4 – ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE GETOXICIDADE DIRETA E INDIRETA COM *ARTEMIA*: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Clessius Ribeiro de Souza^a, Gabriel Souza-Silva^a, Fernanda Viana Moreira Silva^b, Paula von Randow Cardoso^b, Walter dos Santos Lima^c, Cintia Aparecida de Jesus Pereira^c, Marcos Paulo Gomes Mol^b, and Micheline Rosa Silveira^a

^aSocial Pharmacy Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

^bDepartment of Research and Development, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil;

^cDepartment of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART A

<https://doi.org/10.1080/10934529.2024.2384216>

Pages 305-320 | Received 15 Apr 2024, Accepted 20 Jul 2024, Published online: 01 Aug 2024

Resumo

Artemia é um gênero de artemia adaptado a habitats extremos, com salinidade de 5-25 g/L e temperaturas de 9 a 35 °C. Está amplamente distribuído e é utilizado como biomarcador da qualidade ambiental. As espécies *Artemia franciscana* e *Artemia salina* são normalmente utilizadas em estudos ecotoxicológicos e ensaios de genotoxicidade devido ao seu ciclo de vida curto, elevada taxa de fecundidade, facilidade de cultura e disponibilidade. Assim, considerando a importância desses testes em estudos ecotoxicológicos, o presente estudo teve como objetivo apresentar o gênero *Artemia* como modelo biológico em pesquisas de genotoxicidade. Para tanto, realizamos uma revisão da literatura, analisando dados publicados até julho de 2023 nas bases de dados Web of Science, SCOPUS, Embase e PubMed. Após triagem, selecionamos 34 estudos nos quais foi avaliada a genotoxicidade de *Artemia* para diversas substâncias. Esta revisão apresenta a variabilidade do planejamento experimental de ensaios e biomarcadores em genotoxicidade utilizando o gênero *Artemia* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos e mostra a possibilidade de monitorar alterações bioquímicas e efeitos de danos genéticos. Destacam-se ainda tecnologias inovadoras como a análise transcriptômica e metabolômica, bem como estudos em gerações sucessivas para identificar alterações no DNA e consequentemente na expressão gênica.

Palavras-chaves: Artemia; Bioensaios; Atividade enzimática; Expressão Gênica; Ecotoxicologia

Introdução

Artemia é um gênero composto por pequenos crustáceos da ordem Anostraca. Estes organismos têm um tamanho corporal pequeno e adaptabilidade a recursos nutricionais variados, uma vez que se trata de um filtro não seletivo [1]. Estão bem adaptados a habitats extremos, como intervalos de salinidade de 5-250 g/L e temperaturas de 6 a 35°C, com uma ampla distribuição geográfica [2]. A *Artemia* é caracterizada como um consumidor primário, alimentando-se principalmente de algas, atuando como um elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores [3]. Entre as espécies que compõem este gênero, destacam-se a *Artemia franciscana* e a *Artemia salina*, que são muito utilizadas na investigação ecotoxicológica e de genotoxicidade [4]. Estas espécies têm um ciclo de vida rápido, com náuplios que se transformam em adultos em duas a três semanas, e uma elevada taxa de fecundidade, o que as torna modelos biológicos adequados para experiências laboratoriais [1]. Em condições ambientais adversas, as artêmias produzem ovos diapausados que secam, formando cistos resistentes após a libertação [5].

Estes cistos podem ser facilmente induzidos a eclosão em condições laboratoriais. Além disso, várias outras características favorecem a sua utilização em estudos de genotoxicidade, tais como a grande disponibilidade e facilidade de cultura, o baixo custo de manutenção em condições laboratoriais, a sensibilidade às alterações ambientais, a ausência de requisitos de avaliação do comitê de ética para testes em animais e a normalização do teste de toxicidade. No entanto, carece de padronização para ensaios de genotoxicidade e substâncias padrão para biomarcadores. Apresenta muitas variações metodológicas e poucos estudos de expressão genética com o gênero *Artemia* [6, 7].

Embora existam relatos há mais de um século sobre o uso de *Artemia* em pesquisas laboratoriais [8], a *Artemia* foi proposta como organismo para bioensaios laboratoriais apenas em 1956 [9]. Durante esse período, estudos visavam compreender a biologia e o comportamento desse organismo, principalmente sobre os efeitos da exposição de cistos e náuplios de *A. salina* a sais [10-14].

O número de estudos utilizando *Artemia* como modelo biológico aumentou consideravelmente a partir da década de 1950 [15-17]. A partir daí, resultados como mortalidade, mobilidade, reprodução, taxas de eclosão, crescimento e desenvolvimento do organismo foram explorados sob diferentes condições, como temperatura, pH, salinidade, fotoperíodo e tempo de exposição à substância em estudo [18].

Em geral, a investigação ecotoxicológica que utiliza ensaios de genotoxicidade em invertebrados de água salgada visa determinar a possibilidade dos compostos químicos antropogênicos causarem danos ou suprimirem o material genético do organismo. No entanto, há poucas informações sobre alterações na dinâmica populacional das *Artemia* após a exposição a uma determinada substância e identificação de efeitos transgeracionais [19, 20]. Assim, para responder a essa questão, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que transcendam a coleta de evidências de genotoxicidade (como alterações genéticas e enzimáticas), relacionando os danos genéticos com alterações em atributos fenotípicos que influenciam o crescimento e o sucesso reprodutivo do organismo.

Vários compostos químicos ganharam destaque na ecotoxicologia durante décadas, principalmente por modificarem a biodiversidade aquática. A capacidade de reduzir o potencial de crescimento ou sobrevivência do organismo tem impacto na população e, conseqüentemente, produz um desequilíbrio na cadeia alimentar, uma vez que a *Artemia* serve de alimento para muitas espécies no ambiente, incluindo peixes. Além disso, muitos destes poluentes causam danos genéticos, influenciam a constituição genética das populações e desencadeiam efeitos de bioacumulação no ambiente [21-23].

Em 2002, um estudo realizado em Espanha avaliou a genotoxicidade aguda (24 horas de exposição) dos pesticidas diclorvos e clorpirifós em náuplios de *A. salina* e *A. parthenogenetica* [24]. A atividade da enzima colinesterase (ChE/AChE) e a sua redução após a exposição foram determinadas num ensaio espectralométrico [24]. Outro estudo avaliou a genotoxicidade crônica (28 dias de exposição) de diferentes biotoxinas, como a Microcistina-LR e a Microcistina-HtyR, em adultos de *A. salina*, observando um aumento da atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST), responsável pela biotransformação do organismo após a exposição [25]. A linha do tempo sobre a utilização de *Artemia* em estudos ecotoxicológicos é apresentada na figura 1.

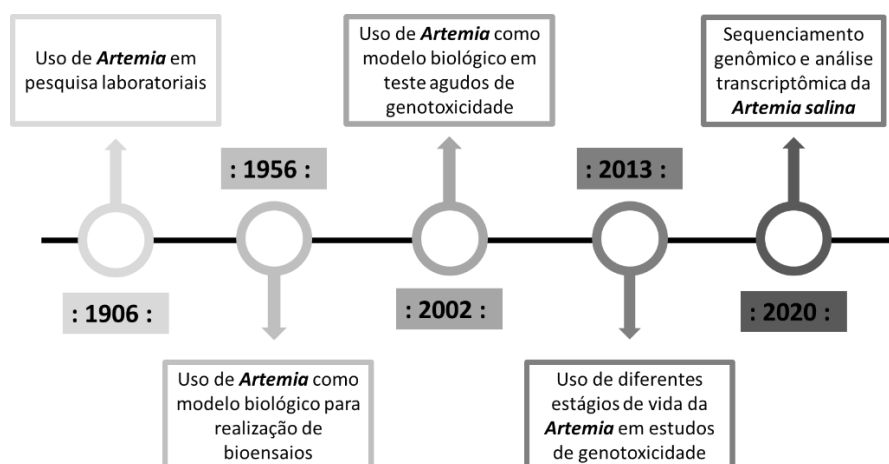


Figura 1. Linha cronológica da breve história da utilização de *Artemia* como modelo biológico em ensaios de genotoxicidade.

A utilização de *Artemia* em ensaios de genotoxicidade vem aumentando com aplicação em diferentes fases de vida, além de maior utilização de novos biomarcadores (como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a ChE e a GST). Em 2013, náuplios, jovens e adultos foram expostos a um mutagênico de referência (metanossulfonato de etila) durante 21 dias para avaliar os danos genéticos por meio do ensaio cometa [19]. No ano seguinte, foi avaliada a genotoxicidade das nanopartículas de negro de fumo por western blot na expressão do gene da proteína de choque térmico de 70-kDa (hsp70), responsável por desencadear uma resposta ao stress nos náuplios de *A. franciscana* [26].

A genotoxicidade das nanopartículas de poliestireno catiônico modificado com aminoácidos foi avaliada em náuplios de *A. franciscana* com RT-PCR [27]. Avaliaram e observaram o aumento da expressão dos genes da proteína associada à catepsina L (clap) e do inibidor da cistatina B (cstb), ambos relacionados com o desenvolvimento e a diferenciação do organismo.

Mesmo com o aumento do número de genes utilizados nos estudos, somente em 2020 foi possível avaliar mais de 250 mil genes por meio do sequenciamento da *A. salina* [28], ampliando e contribuindo direta ou indiretamente para a produção de estudos de genotoxicidade envolvendo diversos genes e enzimas [29-34]. As principais vantagens da utilização da *Artemia* como modelo biológico para estudos ecotoxicológicos são a facilidade de cultivo, disponibilidade facilitada (cistos), reconhecida pela USEPA, adaptabilidade a condições adversas, organismo invertebrado sensível a mudanças ambientais e baixo custo de manutenção. Porém, tem como desvantagens poucos estudos de expressão gênica, falta de

métodos padronizados para ensaios de genotoxicidade, falta de substâncias padrão para muitos biomarcadores e muitas variações metodológicas [35].

As espécies *A. salina* e *A. franciscana* têm sido frequentemente utilizadas em estudos ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade de diversos compostos químicos, tais como resíduos farmacêuticos [31, 36, 37], metais pesados [38-42]; nanopartículas [27, 43-46]; amostras de efluentes [47]; pesticidas [24, 31, 37]; entre outras substâncias [20, 28, 30, 32, 48, 49]. Além disso, a atividade enzimática das suas células pode ser utilizada como biomarcador por meio da monitorização das enzimas ChE [34, 49, 50], Carboxilesterase (CbE) [36, 51], aldeído desidrogenase (ALDH), glutathione peroxidase (GPx), GST, proteínas de choque térmico (HSPs) [35, 52], e CAT [32].

As alterações enzimáticas e metabólicas são geralmente respostas biológicas à demanda no nível celular para manter a homeostase do sistema, a princípio, sem qualquer alteração genética [4, 53]. No entanto, os xenobióticos em concentrações subletais podem promover danos imperceptíveis ao DNA para os resultados primários avaliados, como fecundidade, mortalidade e comportamento, facilmente identificáveis por meio do ensaio cometa e correlacionados com alterações metabólicas ou fisiológicas (Figura 2) [53].

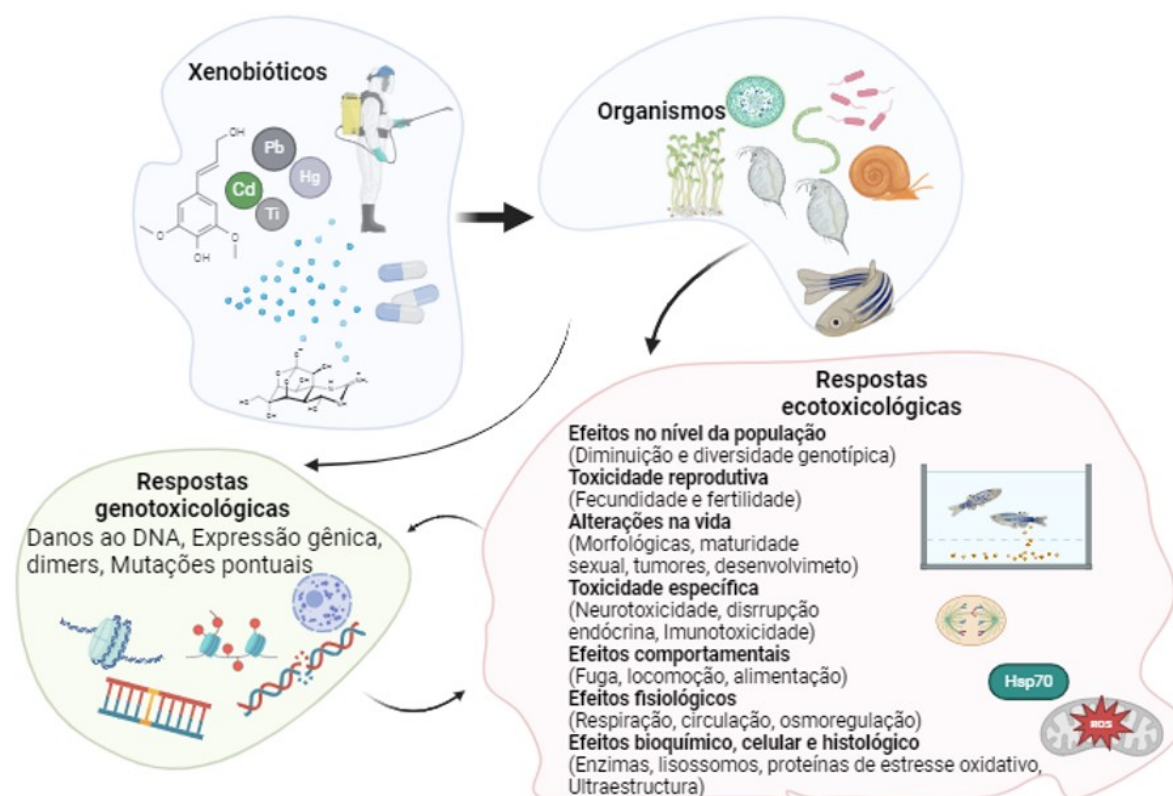


Figura 2. Relação da genotoxicidade com as respostas ecotoxicológicas.

A. salina tem proporcionado um vasto banco de dados para estudos moleculares [28, 49, 54, 55], ampliando assim as possibilidades de pesquisa com novos biomarcadores para avaliar, principalmente, os níveis de expressão de genes relacionados ao crescimento, desenvolvimento (Haloacid dehalogenase (HAD-like), *cstb*, Total phenolic content (TPC), *clap*, Uncoupling protein 2 (UCP2), e proteína 48 de controle da divisão celular (CDC48), stress (*hsp26*, *hsp60*, *hsp70*, cicloxigenase I (*coxI*) e cicloxigenase III (*coxIII*)) e resposta imunitária (*sod*, *gst*, peroxinectina (*pxn*), lipopolissacárido e proteína de ligação ao β -1,3-glucano (*lgbp*), molécula de adesão celular da síndrome de Down (*dscam*), profenoloxidase (*proPO*) e proteína da caixa do grupo de alta mobilidade (*hmgb*) [27, 30, 33, 36, 48, 51, 56].

A utilização de abordagens moleculares que avaliam os danos no ADN ou as alterações na concentração de ARNm de genes críticos é essencial para complementar os efeitos clássicos em estudos ecotoxicológicos. Um estudo italiano mostrou que a exposição de *A. franciscana* ao benzo(k)fluoranteno não revelou toxicidade para a espécie quando se avaliaram apenas os resultados clássicos [30]. No entanto, quando se analisou a expressão genética, observaram-se alterações significativas na expressão de proteínas específicas (como *hsps*) em comparação com o grupo controle [30]. Outro estudo mostrou que o crescimento e o desenvolvimento em náuplios com 48 horas de idade foram afectados de forma dependente da dose e que os genes envolvidos na proteção celular, no desenvolvimento e na muda foram modulados após a exposição a uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de poliestireno [51]. A exposição de *A. salina* à biotoxina (Gonyautoxin 2/3) induziu a expressão de *hsp70* e inibiu a formação de quitina [28]. Alguns genes essenciais, tais como os que expressam *clap* e *cstb*, que desempenham um papel no crescimento larval e na muda da artêmia, podem ser significativamente induzidos por 1 mg/L de nanopartículas de poliestireno amino catiônico (PS-NH₂) de artemia [27, 51].

Este estudo seguiu a maioria das orientações metodológicas das revisões sistemáticas propostas pelo PRISMA, com foco em possíveis alterações genéticas ou danos no DNA, em contraste com as contribuições significativas das abordagens não sistemáticas dos trabalhos de toxicidade realizados por Albarano et al.[4] e Libralato et al.[35], que incluíram bioensaios de curto e longo prazo sem correlação direta com alterações genéticas ou nucleares.

Assim, considerando a importância das abordagens moleculares em estudos ecotoxicológicos utilizando a *Artemia* como modelo biológico, o presente trabalho teve como objetivo apresentar os testes e o desenho metodológico de genotoxicidade utilizando a *Artemia* como modelo biológico para avaliações ecotoxicológicas por meio da verificação de danos no

DNA, alteração de atividades enzimáticas/metabólicas ligadas a mudanças ou expressões gênicas.

Metodologia

Estratégia de busca

Os estudos foram pesquisados nas bases de dados Web of Science, SCOPUS, Embase e PubMed. Além destas bases de dados, foi efetuada a pesquisa manual utilizando o agregador de bases de dados Google Scholar. As palavras-chave *Artemia*, mutagenesis, gene, DNA, RNA, enzyme e genotoxicity foram combinadas para formar o descritor: “*Artemia* AND (mutagenesis OR genotoxicity) AND (enzyme OR gene OR DNA OR RNA)”, utilizado para buscar publicações de interesse em bases de dados publicadas até julho de 2023. O descritor utilizado não se restringiu aos títulos e resumos dos artigos. A revisão seguiu as diretrizes recomendadas pelo Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) com adaptações [57].

Crítérios de elegibilidade

Para esta revisão, os critérios de inclusão dos artigos foram os seguintes (i) utilização de *Artemia* (ii) dados de genotoxicidade (danos no DNA, alterações nas atividades enzimáticas/metabólicas ligadas à alteração de genes ou a expressão de genes); (iii) estudo ecotoxicológico, e (iv) inclusão de um grupo de controle. Os critérios de exclusão foram: (i) artigos de revisão científica; (ii) que não utilizaram *Artemia* como modelo biológico; (iii) estudo com exposição à radiação; (iv) ausência de dados de genotoxicidade (estudos de mortalidade); (v) artigos duplicados; e (vi) idioma diferente do inglês. Nesta revisão, os estudos de genotoxicidade foram classificados como artigos com desenho experimental sobre a capacidade dos compostos de causar ou não danos ou alterações no DNA/gene ou indiretamente (através de atividade enzimática) em qualquer fase da vida da *Artemia*.

Seleção dos estudos

O software Rayyan foi utilizado no processo de triagem dos artigos [58]. Para a primeira etapa do processo de triagem, as palavras-chave (i) *Artemia*, (ii) DNA, (iii) mutagênese, (iv) genotoxicidade e (v) colinesterase foram programadas para inclusão de artigos, enquanto a

palavra (i) revisão foi programada para exclusão. Embora outras enzimas possam estar envolvidas em respostas genotóxicas, para a seleção dos estudos, a ChE é comumente estudada em ecotoxicologia e, por isso, foi escolhida como foco da triagem, o que não eliminou dados envolvendo outras enzimas. A segunda fase do processo de triagem consistiu na leitura completa dos artigos selecionados na primeira fase. Nesta etapa, foram selecionados artigos com resultados de genotoxicidade utilizando *Artemia* como modelo biológico. Finalmente, após a leitura integral dos textos, os artigos foram selecionados para composição e extração de dados para esta revisão.

Extração dos dados

Antes da extração de dados, os autores estabeleceram uma lista de informações a serem extraídas de cada trabalho incluído nesta revisão. Os seguintes dados foram extraídos de cada estudo por dois pesquisadores: ano, referência, local do estudo (foi considerado o país da instituição de pesquisa relacionada ao primeiro autor.); espécie como descrita nos artigos, idade, estágio de vida (informações do modelo); classificação, substância, solubilização, concentração (informações da matriz); tamanho da amostra, número de réplicas, tempo, temperatura, salinidade, fotoperíodo, alimentação, meio, volume (informações da exposição); e, tipo de ensaio, método de ensaio, alvo, correlação e resultados (informações do resultado). Além disso, algumas informações, como alimentação, manutenção e características das espécies, foram extraídas para complementar esta revisão.

Resultados e discussão

Estudos selecionados

A pesquisa identificou duzentos e nove artigos: 31 na Web of Science, 67 na SCOPUS, 59 na Embase e 51 na PubMed. Após a exclusão dos duplicados, restaram 110 artigos. Em seguida, outros 64 artigos foram rejeitados com base no título e no resumo, restando 46 para serem lidos na íntegra. Finalmente, após a leitura dos textos completos, um total de 34 artigos [19, 20, 24-34, 36, 37, 40, 44, 46, 48-52, 59-69], publicados de 2002 a 2023, foram incluídos nesta revisão (Figura 3).

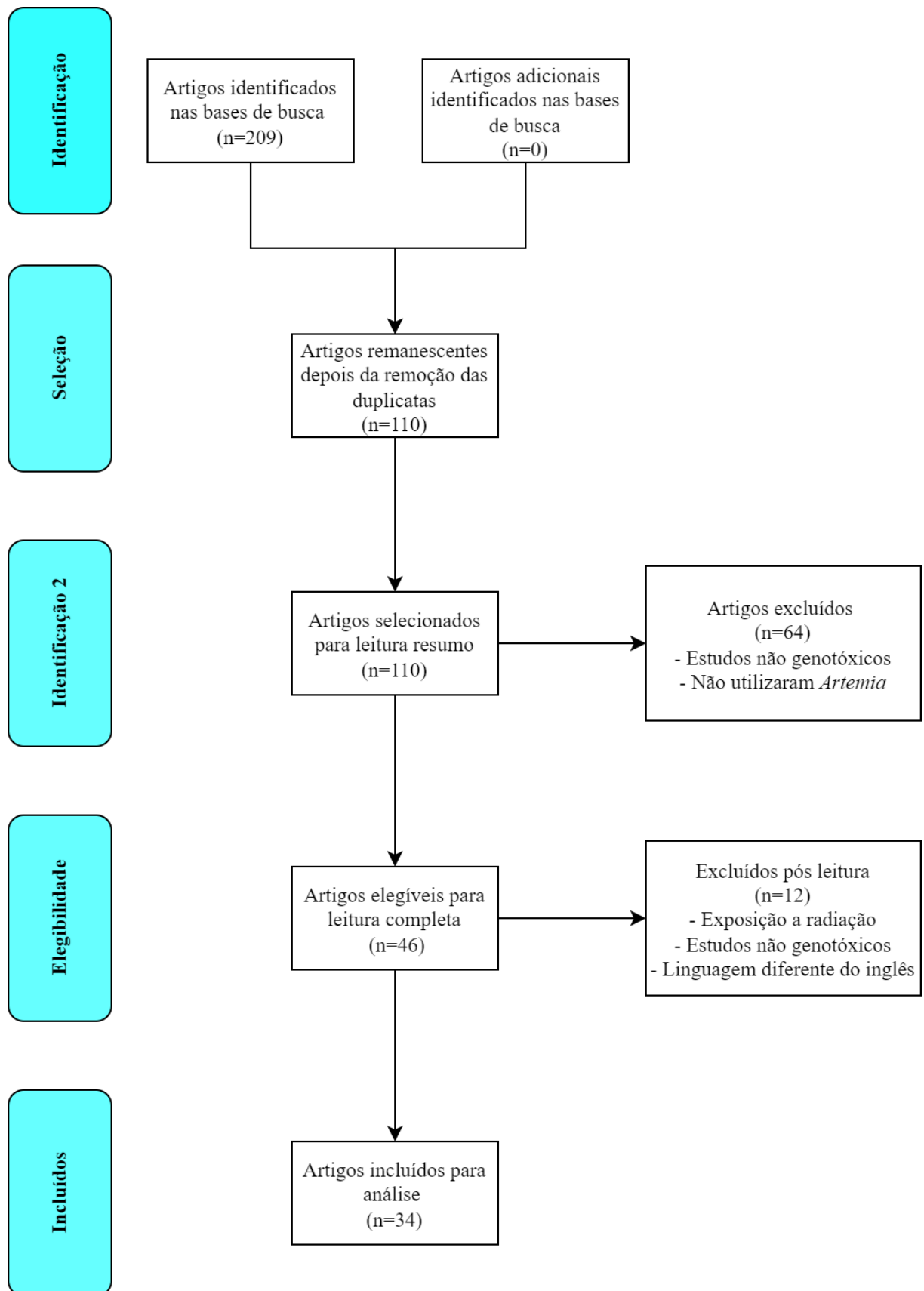


Figure 3. Fluxograma (PRISMA) das fase do processo de seleção dos artigos.

Estudos incluídos

A Tabela 1 mostra os estudos selecionados para esta revisão com os principais resultados de estudos ecotoxicológicos utilizando *Artemia* como modelo biológico para testes de genotoxicidade. Os principais biomarcadores utilizados nos estudos incluídos foram: (i) atividade enzimática [24, 25, 29, 31, 32, 34, 36, 40, 44, 46, 49-52, 60-62, 64-69]; (ii) expressão gênica [26, 27, 30, 33, 48, 51]; (iii) dano genético [19, 20, 28, 37, 59]; atividade metabólica [28, 63]. Excepcionalmente, mais de uma alteração foi utilizada nos estudos de genotoxicidade. A expressão dos genes e a atividade enzimática foram utilizadas como biomarcadores em um único estudo [51], e os danos genéticos e a atividade metabólica simultaneamente em outro estudo [28].

Tabela 1. Estudos de genotoxicidade selecionados tendo *Artemia* como modelo biológico

Referências	Local do estudo	Espécies	Estágio de vida	Matriz analisada	Concentração	n	Replicatas	Tempo	Analises	Objetivo genético
Albarano et al., 2023 (ALBARANO et al., 2023a)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Tratamento de HAPs com Ferro Nano-zero-valente (nZVI) e Carvão Ativado (AC)	1 mg/L	200	3	48 h	GE	HAD-like, tcp, UCP2 e CDC48 genes
Albarano et al., 2023 (ALBARANO et al., 2023a)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Adultos	Tratamento de HAPs com Ferro Nano-zero-valente (nZVI) e Carvão Ativado (AC)	1 mg/L	10	3	48 h	GE	hsp26, hsp60, hsp70, coxI e coxIII genes
Albarano et al., 2023 (ALBARANO et al., 2023b)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Fenantreno, Naftaleno, Fluoranteno e Benzo(k)fluoranteno (BkF)	1.15, 0.26, 0.81 e 84.6 mg/L, respectively.	200	3	48 h	GE	HAD-like, tcp, UCP2 e CDC48 genes
Albarano et al., 2023 (ALBARANO et al., 2023b)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Adultos	Fenantreno, Naftaleno, Fluoranteno e Benzo(k)fluoranteno (BkF)	1.15, 1.45, 0.81 e 84.6 mg/L, respectively.	10	3	48 h	GE	hsp26, hsp60, hsp70, coxI e coxIII genes
Albendín et al., 2021 (ALBENDÍN et al., 2021)	Espanha	<i>A. salina</i>	Adultos	Simvastatina	12.03, 10.03, 8.35, 6.96, 5.80 e 52.08 mg/L	10	3	48 h	AE	ChE
Albendín et al., 2021 (ALBENDÍN et al., 2021)	Espanha	<i>A. salina</i>	Adultos	Carbamazepina	43.40, 36.17, 30.14 e 25.16 mg/L	10	3	48 h	AE	ChE

N et al., 2021)											
Albendín et al., 2021 (ALBENDÍ N et al., 2021)	Espanha	<i>A. salina</i>	Adultos	Triclosan	12, 6, 3, 1.5, 0.75 e 0.0312 mg/L	10	3	48 h	AE	ChE	
Albendín et al., 2021 (ALBENDÍ N et al., 2021)	Espanha	<i>A. salina</i>	Adultos	Clopirifós	0.0156, 0.0078, 0.0039 e 0.00195 mg/L	10	3	48 h	AE	ChE	
Arulvasu et al., 2014 (ARULVA SU et al., 2014)	Índia	<i>Artemia spp.</i>	Náuplio	AgNPs	2, 4, 6, 8, 10 e 12 nM	10	3	24 e 48 h	GE	DNA	
Bergami et al., 2017 (BERGAM I et al., 2017)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Amino polistireno modificado	0, 0.1 e 1 µg/ml	200	3	48 h	GE	clap e cstb genes	
Cavion et al., 2022 (CAVION et al., 2022)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Adultos	Palitoxina	0.1, 1.0 e 10 nM	50	3	12 h	AE	GST, CAT, POD, SOD e ChE	
Cavion et al., 2020 (CAVION et al., 2020)	Itália	<i>A. franciscana</i>	Adultos	Óxido de grafeno	1, 10 e 100 µg/mL	50	3	24 e 72 h	AE	GST e ChE	

Comeche et al., 2017 (COMECH E et al., 2017)	Espanha	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Metilparabeno	0.05 e 0.1 mg/L	200	3	48 h	AE	ChE, CbE, GST e CAT
Jeyavani et al., 2022 (JEYAVANI et al., 2022)	Índia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Polipropileno	1, 25, 50, 75 e 100 µg/mL	10	3	48 h	AE	SOD, CAT, GHS, GST e ChE
Jeyavani et al., 2022 (JEYAVANI et al., 2022)	Índia	<i>A. salina</i>	Metanáuplio	Polipropileno	1, 25, 50, 75 e 100 µg/mL	10	3	48 h	AE	SOD, CAT, GHS, GST e ChE
Jeyavani et al., 2022 (JEYAVANI et al., 2022)	Índia	<i>A. salina</i>	Jovem	Polipropileno	1, 25, 50, 75 e 100 µg/mL	10	3	48 h	AE	SOD, CAT, GHS, GST e ChE
Lee et al., 2017 (LEE et al., 2017)	Corea do Sul	<i>A. salina</i>	Náuplio	Tributiltina	0.001, 0.01, 0.05 e 0.1 µg/L	10	5	48 h	AE	ChE
Lee et al., 2017 (LEE et al., 2017)	Corea do Sul	<i>A. salina</i>	Náuplio	Diuron	500, 1000, 2500 e 5000 µg/L	10	5	48 h	AE	ChE
Lee et al., 2017 (LEE et al., 2017)	Corea do Sul	<i>A. salina</i>	Náuplio	Irgarol 1051	50, 100, 250 e 500 µg/L	10	5	48 h	AE	ChE
Morgan et al., 2019	EUA	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Glifosato	1, 10, 50 e 100 mg/L	20	10	48 h	ME	Alamina, Arginina, Asparaginina, Aspartame, Glutamato, Glutamina, Glicina, Histidina,

(MORGAN
et al., 2019)

Isolceucina, Leucina,
Lisine, Metionina,
Fenilalanina, Prolina,
Serina, Treonina,
Triptofano, Tirosina,
Valina, Betaina, Colina,
Fromato, Glicerol,
Glicerofosfocolina,
Homarina, Lactato,
Metanol, FosFocholina,
Taurina, Gadusol, Glicose,
Maltose, Mio-inositol, N-
acetilglucosamina,
Trehalose, Cítidina
Guanosina, Inosina, Uracil,
Ácido úrico, Uridina,
Ornitina, Ornithina-1,5-
Lactam, Putrescina, Urea,
L-DOPA, Gliceril-prolina,
Piroglutamato,
Isopropilamina

Rodd et al., 2014 (RODD et al., 2014)	EUA	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Carbón negro	25, 50 e 75 mg/L	500	1	24 h	GE	Gene hsp70
Sukumaran and Grant, 2013(SUK UMARAN; GRANT, 2013b)	Reino Unido	<i>A. franciscana</i>	Náuplio, Jovem e Adultos	Metano etil sulfonato	85, 110, 135 e 160 mg/L	10	3	21 d	GE	DNA
Sukumaran and Grant, 2013 (SUKUMA RAN;	Reino Unido	<i>A. franciscana</i>	Náuplio e Jovem	Metano etil sulfonato	85, 110, 135 e 160 mg/L	9	3	21 d	GE	DNA

GRANT, 2013a)											
Sukumaran and Grant, 2013 (SUKUMARA N; GRANT, 2013a)	Reino Unido	<i>A. parthenogenetica</i>	Náuplio e Jovem	Metano etil sulfonato	85, 110, 135 e 160 mg/L	9	3	21 d	GE	DNA	
Varó et al., 2019 (VARÓ et al., 2019)	Espanha	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Poliestireno	0.1, 1 e 10 mg/L	200	3	48 h e 14 d	AE	CbE, ChE, GST, CAT, POD e HSP	
Varó et al., 2019 (VARÓ et al., 2019)	Espanha	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Poliestireno	0.1, 1 e 10 mg/L	200	3	48 h e 14 d	GE	HSP26, HSP70, cstb, TPC e genes clap	
Varó et al., 2015 (VARÓ et al., 2015)	Espanha	<i>A. franciscana</i>	Metanáuplio , Jovem e Adultos	Clopirifós	0.1, 1 e 5 µg/L	30	5	Until vitellogene sis	EA	ChE	
Varó et al., 2015 (VARÓ et al., 2015)	Espanha	<i>A. partenogenética</i>	Metanáuplio , Jovem e Adultos	Clopirifós	0.1, 1 e 5 µg/L	30	5	Until vitellogene sis	EA	ChE	
Xu et al., 2015 (XU et al., 2015)	China	<i>A. salina</i>	Náuplio	Triclosan e Triclocarban	100 - 500 e 1 - 100 µg/L, respectively.	10	10	6, 12 e 24 h	GE	DNA	
Yi et al., 2020 (YI et al., 2020)	China	<i>A. salina</i>	Adultos	Gonyautoxin 2/3 (<i>Alexandrium minutum</i>)	0.5 µM	200	3	24 h	GE	259.573 genes	

Yi et al., 2020 (YI et al., 2020)	China	<i>A. salina</i>	Adultos	Gonyautoxin 2/3 (<i>Alexandrium minutum</i>)	0.5 µM	200	3	24 h	ME	Citina, Glucosamina, Aminoglcans e Aminoaçucares
Abushaala et al., 2021 (ABUSHAALA; ELFITURI; ZULKIFLI, 2021)	Líbia	<i>A. salina</i>	Adultos	Cloridrato de tributiltina	25, 50, 100, 200 e 300 ng/L	50	5	24 h	EA	Caspase 3 e HSP
Beattie et al., 2003 (BEATTIE et al., 2003)	Reino Unido	<i>A. salina</i>	Adultos	Microcistina-LR, Microcistina-HtyR e ciclico cianobacterial pentapeptidio nodular hepatotoxina	0.5 µg/L	5	5	24 h	EA	GST
Cimen et al., 2020 (CIMEN; DANABAS; ATES, 2020)	Turquia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Cobre	0.2, 1, 5, 10, 25 e 50 mg/L	15000	3	24, 48 e 72 h	EA	GST
Sugantharaj David et al, 2017 (SUGANTHARAJ DAVID et al., 2017)	Índia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Cerium (nano)	0.3, 3, 9, 18, 25 e 32 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, SOD, ChE e GST
Sugantharaj David et al, 2017	Índia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Cerium (a granel)	0.7, 7, 14, 28, 56 e 100 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, SOD, ChE e GST

(SUGANT
HARAJ
DAVID et
al., 2017)

Demarchi et al., 2020 (DEMARC HI et al., 2020)	Brasil	<i>A. salina</i>	Náuplio	O-carboximetilquitosana carregada de prata	500 mg/L	500	1	48 h	EA	GST, SOD e CAT
Han et al., 2020 (HAN et al., 2020)	Bélgica	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	Beta-glucana	3.9 mg/L	20	4	6 e 12 h	GE	sod, gst, pxn, lgbp, dscam, Hsp70, proPO, hmgb
Kukavica et al., 2022 (KUKAVI CA et al., 2023)	Bosnia e Herzegovina	<i>A. franciscana</i>	Cysts	Cádmio e zinco	7.7 e 77 mg/L; 14 e 72 mg/L, respectively.	N.A	3	24 e 48 h	EA	CAT, SOD, GST e ChE
Madhav et al., 2017 (MADHA V et al., 2017)	Índia	<i>A. salina</i>	Newborns	Cobre	0.61, 6.1, 30 e 61 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, GST, GHS
Madhav et al., 2017 (MADHA V et al., 2017)	Índia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Cobrer	0.35, 3.5, 15 e 35 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, GST, GHS
Madhav et al., 2017 (MADHA V et al., 2017)	Índia	<i>A. salina</i>	MetaNáupli o	Cobre	0.12, 1.2, 6 e 12 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, GST, GHS

Madhav et al., 2017 (MADHAV et al., 2017)	Índia	<i>A. salina</i>	Adultos	Cobre	3.5, 35, 70 e 140 mg/L	10	3	48 h	EA	CAT, GST, GHS
Mohamed et al., 2014 (MOHAMED et al., 2014)	Egito	<i>A. salina</i>	Adultos	Cádmio e ferro	5 mg/L e 30 mg/L, respectively	30	3	24 h, 72 h e 7 d	EA	SOD, CAT e GPx
Sirdarta and Cock, 2010 (SIRDAARTA; COCK, 2010)	Austrália	<i>A. franciscana</i>	Náuplio	<i>Aloe barbadensis</i>	3%	10000	3	24 h	EA	GHS, GPx e TrxR
Tapia-Salazar et al., 2022 (TAPIA-SALAZAR ; DIAZ-SOSA; CÁRDENAS-CHÁVEZ, 2022)	México	<i>A. salina</i>	Náuplio	p-fenilenediamine (PPD)	0, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210 e 220 mg/L	10	3	24 e 48 h	EA	GST, GPx, LDH e ChE
Tapia-Salazar et al., 2022 (TAPIA-	México	<i>A. salina</i>	Náuplio	Sulfato de 2,5-diaminotolueno (PTD)	0, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 e 400 mg/L	10	3	24 e 48 h	EA	GST, GPx, LDH e ChE

SALAZAR ; DIAZ- SOSA; CÁRDEN AS- CHÁVEZ, 2022) Tapia- Salazar et al., 2022 (TAPIA- SALAZAR ; DIAZ- SOSA; CÁRDEN AS- CHÁVEZ, 2022) Tapia- Salazar et al., 2022 (TAPIA- SALAZAR ; DIAZ- SOSA; CÁRDEN AS- CHÁVEZ, 2022)	México	<i>A. salina</i>	Náuplio	Benzofenona (BZ)	0, 1.5, 3, 6, 9, 112, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 mg/L	10	3	24 e 48 h	EA	GST, GPx, LDH e ChE
SALAZAR ; DIAZ- SOSA; CÁRDEN AS- CHÁVEZ, 2022) Tapia- Salazar et al., 2022 (TAPIA- SALAZAR ; DIAZ- SOSA; CÁRDEN AS- CHÁVEZ, 2022)	México	<i>A. salina</i>	Náuplio	Tetrabromobisfenol A (TBBPA)	0, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 µg/L	10	3	24 e 48 h	EA	GST, GPx, LDH e ChE
Rao et al., 2007 (RAO et al., 2007)	Índia	<i>A. salina</i>	Náuplio	Acefato, Clorpirifós, Monocrotofos e Profenofós	2350, 0.4, 262.7 e 7.7 mg/L, respectively	10	5	24 h	EA	ChE

Wang et al., 2017 (WANG et al., 2017)	China	<i>A. salina</i>	Náuplio	Ferro	25, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/L	1000	1	24 h	EA	SOD, CAT, GPx
Zhu et al., 2017 (ZHU et al., 2017a)	China	<i>A. salina</i>	Náuplio	Óxido de grafeno	25, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/L	1000	1	24 h	EA	SOD, CAT, GPx
Zhu et al., 2017 (ZHU et al., 2017b)	China	<i>A. salina</i>	Náuplio	Fe ₂ O ₃	25, 50, 100, 200, 400 e 600 mg/L	1000	1	24 h	EA	SOD, CAT, GPx
Varó et al., 2002 (VARÓ et al., 2002)	Espanha	<i>A. salina</i> and <i>A. parthenogenetica</i>	Náuplio	Diclorvós e Clorpirifós	5.38, 6.46, 7.75 e 9.3 mg/L	200	3	24 h	EA	ChE
Varó et al., 2002 (VARÓ et al., 2002)	Espanha	<i>A. salina</i> and <i>A. parthenogenetica</i>	Náuplio	Diclorvós e Clorpirifós	1.85, 2.22, 2.66 e 3.19 mg/L	200	3	24 h	EA	ChE

Legend: GE – Genotoxicidade; EA – Atividade enzimática; ME – Atividade metabólica; ALDH – Aldeído desidrogenase; CAT – Catalase; CbE – Carboxilesterase - CDC48 – *Controle da divisão celular proteína 48*; ChE – Colinesterase – clap – Proteína associada a *Catepsina L*; coxI - *cicloxygenase I*; coxIII - *cicloxygenase III*; cspb – Inibidor da *cistatina B*; dscam - *molécula de adesão celular da síndrome de down* – GHS – Glutathione redutase; GPx – Glutathione peroxidase; GST - Glutathione S-Transferase; HAD-like - *haloácido desalogenase*; hmgb - caixa de proteína de grupo de alta mobilidade; Hsp70 - *70-kDa proteína de choque térmico*; LDH – Lactato desidrogenase; Igpb – lipopolissacarídeo e β-1,3-glucano-proteína de ligação; POD – Peroxidase; proPO – Profenoxidase; pxn – Peroxinectina; SOD - Superoxido dismutase; TrxR - Tio redoxina redutase; UCP2 – *Proteína de desacoplamento 2*

Desenho experimental

Os dados analisados neste estudo mostraram variações na concentração experimental e nos protocolos de utilização de *Artemia* em ensaios de genotoxicidade. Essas variações ocorrem principalmente devido à substância analisada e ao estágio de vida da *Artemia*.

Condições experimentais

Durante os experimentos, a *Artemia* adulta (16-28 dias) foi geralmente mantida em recipientes de vidro (como tubos, béqueres, frascos e frascos de Erlenmeyer) com volume entre 0,03 até 2,5 mL por organismo. O meio de exposição predominante para os náuplios foram placas de cultura (6, 12, 24 ou 96 poços) e placas de Petri, com volume aproximado entre 0,005 até 4 mL de meio por organismo. Essas condições de uso de placas e tubos de poços, comuns em laboratórios, e o menor volume de soluções a serem utilizadas, sugerem tendências no sentido de minimizar os impactos da gestão de resíduos. Tanto para os náuplios quanto para os demais estágios do ciclo de vida do artêmia, a temperatura variou de 17°C a 30°C, com média de 25°C. A salinidade média variou de 30 a 38 mg/L. O fotoperíodo utilizado nos estudos foi de 0:24; 12:12; 14:10; 16:8 e 24:0 horas (claro/escuro), com predominância do uso do fotoperíodo de 16:8 horas (claro/escuro).

Outro parâmetro relacionado às condições experimentais avaliadas neste estudo foi a alimentação dos organismos durante o período de exposição. A alimentação das artêmias foi restrita na maioria dos estudos (n=25; 78,1%); apenas em alguns casos (n=7; 21,9%) os organismos foram alimentados com *Tetraselmis suecica* [36, 51], suspensão de minerais e algas (Hobby Liquizell®) [19, 20], *Chlorella vulgaris* [49], ou *Dunaliella salina* e *T. suecica* [50].

Além disso, um estudo [33] não apresentou informações sobre a alimentação das artêmias. Em ensaios de exposição aguda a xenobióticos, três estudos mantiveram a alimentação das artêmias. [36, 49]. Durante a exposição crônica, todos os estudos mantiveram o fornecimento de alimentos para artêmias [19, 20, 50, 51].

Local dos estudos

Os 34 estudos desta revisão foram realizados em 15 países diferentes. Entre eles, a Itália (n=5) [27, 30, 32, 48, 52], a Espanha (n=5) [24, 31, 36, 50, 51] e a Índia (n=5) [34, 44, 59, 65, 67] destacaram-se com o número mais significativo de estudos, seguidos pela China (n=4) [28,

37, 46, 68, 69], Reino Unido (n=3) [19, 20, 25] e Estados Unidos (n=2) [26, 63]. Para a Austrália, Bélgica, Bósnia e Herzegovina, Brasil, Egito, Líbia, México, Coreia do Sul e Turquia, foi identificado um único estudo para cada um deles [29, 33, 40, 49, 60-62, 64, 66].

Espécies de Artemia

Os estudos de genotoxicidade foram efetuados principalmente com *A. salina* (n=17) [24, 25, 28, 29, 31, 34, 37, 40, 44, 46, 49, 60, 61, 65-68] como modelo biológico, seguida de *A. franciscana* (n=14) [19, 20, 62, 64, 70, 26, 27, 30, 32, 33, 36, 50, 51] e *A. parthenogenetica* (n=4) [19, 20, 24, 50]. Apenas o estudo de Arulvasu et al.[59] não especificou a espécie utilizada nos testes. Embora poucos estudos tenham sido realizados com *A. parthenogenetica*, esta espécie tem sido utilizada para avaliar os efeitos toxicológicos de substâncias sobre o desenvolvimento nas fases iniciais da vida e os efeitos transgeracionais, uma vez que apresenta uma reprodução predominantemente assexuada [19, 20, 50]. Por outro lado, *A. franciscana* e *A. salina*, organismos que se reproduzem predominantemente de forma sexuada, são amplamente utilizadas. Assim, uma grande variedade de resultados e genotoxicidade foi observada nos estudos, tais como mortalidade, taxa de eclosão, reprodução, fertilidade, desenvolvimento, natação e bioacumulação [25, 29, 52, 60, 65, 31, 32, 34, 36, 44, 49-51].

Estágios de vida da Artemia

Foram utilizadas diferentes fases do ciclo de vida da *Artemia* para avaliar a genotoxicidade de diferentes substâncias. Entre os estágios de vida (Tabela 2), o estágio de náuplio foi o mais utilizado nos estudos incluídos nesta revisão (n=25), seguido pelo estágio adulto (n=12), juvenil (n=4), metanáuplio (n=3) e cisto (n=1). Além das alterações morfológicas, e dependendo da temperatura, alimentação e condições de oxigênio, os períodos relativos aos instares I e II estão bem estabelecidos nos tempos entre 0 e 12 horas e 8 a 24 horas, respetivamente. Para caracterizar os outros estádios, a morfologia é o que melhor define os estádios de instar III, IV, V, metanáuplios, juvenis e adultos [71, 72]. Os estádios de instar I em que os náuplios ainda não consomem substâncias particuladas porque a boca e o ânus ainda não estão abertos e o instar II em que começam a ingerir alimentos foram os mais utilizados pelos autores. Estas fases são as mais sensíveis no ciclo de vida destes organismos para a manifestação de toxicidade, incluindo genotoxicidade, especialmente o instar II [46, 68].

Embora a maioria dos estudos tenha avaliado apenas um único estágio de vida específico (n=25), outros estudos avaliaram a genotoxicidade das substâncias testadas em dois (n=3), três (n=3) ou quatro (n=1) estágios de vida diferentes da *Artemia*.

Tabela 2. Classificação das fases de vida da *Artemia* utilizadas em estudos de genotoxicidade.

Estágio de vida	Tempo de vida	Referência	
Cistos	0 h	(KUKAVICA et al., 2023)	
Instar I	1 – 8 h	(ALBARANO et al., 2022; BERGAMI et al., 2017; CAVION et al., 2020, 2022; MADHAV et al., 2017; SUGANTHARAJ DAVID et al., 2017; SUKUMARAN; GRANT, 2013a, 2013b; VARÓ et al., 2019; WANG et al., 2017; ZHU et al., 2017a, 2017b)	
Náuplio	Instar II	8 – 24 h	(ARULVASU et al., 2014; COMECHE et al., 2017; HAN et al., 2020; JEYAVANI et al., 2022; MADHAV et al., 2017; SUKUMARAN; GRANT, 2013a; TAPIA-SALAZAR; DIAZ-SOSA; CÁRDENAS-CHÁVEZ, 2022; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017b, 2017a)
	Instar III	24 – 48 h	(COMECHE et al., 2017; WANG et al., 2017; XU et al., 2015; ZHU et al., 2017a, 2017b)
Metanáuplio	5 – 8 d	(JEYAVANI et al., 2022; MADHAV et al., 2017; VARÓ et al., 2015)	
Juvenil	6 – 12 d	(JEYAVANI et al., 2022; SUKUMARAN; GRANT, 2013a, 2013b; VARÓ et al., 2015)	
Adulto	12 – 28 d	(ABUSHAALA; ELFITURI; ZULKIFLI, 2021; ALBARANO et al., 2023a, 2023b; ALBENDÍN et al., 2021; BEATTIE et al., 2003; CAVION et al., 2020, 2022; MADHAV et al., 2017; MOHAMED et al., 2014; SUKUMARAN; GRANT, 2013a; VARÓ et al., 2015; YI et al., 2020)	

Tipos de poluentes

De acordo com os nossos resultados, treze poluentes foram estudados quanto à genotoxicidade em *Artemia*. Foram encontrados estudos com agentes anti-incrustantes [29, 49], biotoxina [25, 28, 32], extrato de plantas [64], fertilizante [33], hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [30, 48], inseticida [67], mutagênico de referência [19, 20], metais traços [40, 62],

nanopartículas [26, 27, 34, 44, 46, 51, 52, 59-61, 65, 68], pesticidas [24, 31, 50, 63], cosméticos [66], produtos farmacêuticos [36, 37] e retardadores de chama [66].

A maioria das publicações sobre nanopartículas nesta revisão estava de acordo com as tendências de investigação que envolvem este tipo de material [73-76]. As consequências genotóxicas das nanopartículas metálicas [44, 59-61, 65, 68, 69], plásticas [27, 34, 51], semicondutoras [46, 52] e semimetálicas [26] variaram entre alterações na atividade enzimática [34, 44, 46, 51, 52, 60, 61, 65, 68, 69], danos no DNA [59] ou aumento da expressão gênica [26, 27], dependendo do tipo de poluente. Os estudos indicam que as nanopartículas têm potencial para desenvolver novos métodos de distribuição de produtos farmacêuticos, pesticidas, insecticidas e semicondutores, com custos de produção e concentrações aplicadas reduzidos [77, 78]. No entanto, as consequências da exposição destes materiais à biosfera carecem de estudos mais aprofundados.

Número de amostras e replicatas

Assim como as demais variáveis avaliadas nesta revisão, as réplicas variaram entre os estudos selecionados, indo de 1 a 10 réplicas, sendo que as triplicatas foram as mais utilizadas (n=19). Embora apenas uma réplica tenha sido utilizada no experimento [26, 61, 68, 69], em alguns estudos, o tamanho da amostra foi relativamente maior do que em estudos que utilizaram três ou quatro réplicas. Em relação ao tamanho da amostra, com base nos dados recolhidos nos artigos incluídos, referentes a *Artemia* adultos, obteve-se uma média de 35 organismos por repetição, sendo que a utilização de 10 *Artemias* por repetição foi a mais frequente (n=4; 36,4%).

A distribuição do tamanho da amostra foi ainda mais significativa para *Artemia* náuplio, variando de 9 a 15.000 organismos por repetição experimental. Embora alguns estudos tenham amostras grandes, como 15.000 [60] e 10.000 organismos [64], a maioria dos estudos utilizou 200 indivíduos por réplica em seus experimentos [24, 27, 30, 36, 48, 51]. Tal como para os adultos, o número de náuplios utilizado depende principalmente das condições experimentais e do tipo de estudo, se centrado na expressão genética ou na atividade enzimática.

Os números sugerem uma falta de normalização dos métodos, tanto para avaliar a expressão genética como a atividade enzimática. A variação do número de indivíduos nas amostras pode ser explicada por fatores relacionados com o método de quantificação e com as características biológicas das artêmias, como a espécie e o estágio de vida [79]. Embora a técnica

Real Time q-PCR seja extremamente sensível, para garantir resultados representativos, é essencial utilizar um número suficiente de indivíduos, especialmente quando existe variabilidade genética ou Ambiental [80]. No caso dos náuplios, pode ser necessário um maior número de indivíduos para garantir uma amostra homogênea e representativa, devido ao seu pequeno tamanho e ao possível efeito de variáveis ambientais. Os adultos podem ser utilizados em menores quantidades devido ao maior volume de material biológico disponível por indivíduo [81]. Ao quantificar a atividade enzimática, os fatores genéticos e ambientais podem contribuir para resultados variáveis. O aumento do material biológico aumenta a precisão dos resultados [82]. Outro fator é a sensibilidade do ensaio. Alguns ensaios enzimáticos são menos sensíveis, exigindo uma maior quantidade de material biológico para obter resultados exatos. Por exemplo, no caso dos náuplios, é necessário utilizar grandes quantidades de amostra para obter um volume suficiente de extrato enzimático [83]. Existe uma tendência para a utilização de microplacas para a leitura dos resultados da atividade enzimática, explicada pela sua agilidade, versatilidade de aplicações e amplo espectro de leitura, que vai da luz ultravioleta à região do visível [32, 34, 36, 49, 52, 61, 66, 69].

Tempo de exposição

O tempo de exposição para a *Artemia* foi um parâmetro dividido em exposição aguda e crônica em muitos estudos, e a exposição aguda foi a mais frequentemente determinada (n=29; 90,5%). Os resultados mostraram que os períodos de exposição usados pelos estudos incluídos nesta revisão foram 6 horas (n=2), 12 horas (n=2), 24 horas (n=15), 48 horas (n=16), 72 horas (n=3), 7 dias (n=1), 14 dias (n=1) e 21 dias (n=2).

Nos estudos que usaram *A. franciscana* como modelo biológico, o tempo de exposição variou de 6 a 72 horas para determinar a exposição aguda e de 14 a 21 dias para exposição crônica. Em um estudo [50] o tempo de exposição foi definido como “até a vitelogenese”. Assim como para a *A. franciscana*, o tempo de exposição variou de 6 a 72 horas para exposição aguda em estudos que usaram *A. salina*. Apenas no estudo de Mohamed et al.[40] usou-se um tempo de exposição de 7 dias como exposição crônica. Para estudos com *A. parthenogenetica*, o tempo de exposição aguda foi de 24 horas, e a exposição crônica foi avaliada após 21 dias.

Várias razões podem influenciar e contribuir para o tempo de exposição variável de um organismo, e as principais são as concentrações e propriedades da substância de teste. Na maioria dos estudos de exposição aguda, a exposição do organismo por 24 horas foi suficiente

para observar alterações genéticas, como nos genes responsáveis pelo desenvolvimento e diferenciação (HAD-like, TPC, UCP2 e CDC48), resposta imune (sod, gst, pxn, lgbp, dscam, proPO e hmgb), resposta ao estresse (hsp26, hsp60, hsp70, coxI e coxIII), alterações nas atividades enzimáticas (ChE, GST, CAT, SOD, CbE, Caspase 3 e HSP) e danos diretos ao material genético [26, 30, 33, 48, 51, 84].

Atividade enzimática

Embora haja pouca disponibilidade de protocolos padronizados para ensaios de genotoxicidade, existem métodos padronizados para quantificar enzimas que fornecem baixa variação metodológica nos estudos incluídos nesta revisão, sendo a espectrofotometria a técnica mais adotada entre os estudos (n=20). Muitas enzimas usadas como biomarcadores nos estudos incluídos nesta revisão estão relacionadas às funções antioxidantes do corpo. A exposição à substância de teste desencadeia um aumento nas atividades enzimáticas de SOD, CAT e GST como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) [25, 32, 34, 40, 44, 46, 52, 60–62, 65, 66, 68, 69].

A enzima ChE, alvo da maioria dos estudos que avaliam a atividade enzimática, é vital na *Artemia*. Sua inibição causa o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e a interrupção das funções nervosas e musculares. Portanto, está diretamente relacionada ao movimento do corpo [24, 31, 65, 67, 32, 34, 36, 49–52, 62].

Além da ChE, entre os estudos incluídos nesta revisão, destacam-se também as enzimas GST [25, 32, 34, 36, 44, 46, 51, 52, 60–62, 65, 66] e CAT [32, 34, 36, 40, 44, 46, 51, 61, 62, 65, 68, 69]. As enzimas GST e CAT são antioxidantes e fundamentais na regulação e defesa do organismo contra o processo oxidativo, atuando na biotransformação e desintoxicação. A CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, enquanto a GST catalisa a conjugação de compostos exógenos com o tripeptídeo glutationa. A baixa atividade de ambas as enzimas aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo, resultando em danos celulares [34, 62]. Na *Artemia*, esse sistema enzimático está diretamente ligado à sensibilidade do organismo e é um potencial indicador de resposta a poluentes ambientais [32, 34, 36, 51, 52]. A peroxidase (POD), a SOD e a tioredoxina redutase (TrxR) também estão relacionadas aos processos antioxidantes do corpo. Essas enzimas atuam na redução de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) podem suprir a demanda de elétrons de radicais livres em organismos, catalisando a dismutação do

superóxido e do radical hidroxila em oxigênio e peróxido de hidrogênio, substâncias menos reativas [62, 85]. Assim, podem realizar a desintoxicação, como a CAT. Por esse motivo, o monitoramento desses bioindicadores tanto em náuplios quanto em adultos pode contribuir para a compreensão dos efeitos das substâncias de teste na capacidade de induzir a produção de ROS e estresse oxidativo por meio de alterações nessas enzimas antioxidantes [32, 34]. Outras enzimas, como CbE, que hidrolisa substratos contendo ligações éster, amida e tioéster, e ALDH, que converte aldeídos em ácidos carboxílicos para facilitar a conjugação ou excreção [86, 87].

Enzimas com atividade antioxidante foram as mais estudadas entre os trabalhos incluídos nesta revisão. Embora estejam relacionadas aos processos de estresse oxidativo em *Artemia*, as enzimas SOD [32, 34, 40, 46, 61, 62, 65, 68, 69], HSP [29, 51], GPx [40, 46, 64, 66, 68, 69] e GSH [34, 44, 64] também estão relacionadas à desintoxicação. Além disso, são biomarcadores utilizados tanto em estudos com náuplios quanto em adultos [32, 34, 36, 40, 44, 51, 61, 62, 65, 68, 69]. Devido às mudanças climáticas, ao aumento de xenobióticos no ambiente e à função específica de proteínas relacionadas na proteção contra estresse térmico e químico, a HSP pode se destacar como um importante biomarcador em estudos ecológicos e ecotoxicológicos.

Relacionados aos processos de apoptose celular, as enzimas Caspase 3 e TrxR foram avaliadas tanto em náuplios quanto em adultos. Como têm funções essenciais no processo de apoptose e no sistema imunológico dos vertebrados, dados obtidos em estudos ecotoxicológicos usando esses biomarcadores sugerem um paralelo entre a atividade enzimática em *Artemia* com organismos mais complexos, como os vertebrados [29, 64].

As enzimas CbE, GST e GSH estão relacionadas aos processos de biotransformação do organismo e, portanto, são comumente avaliadas em náuplios para monitorar seu desenvolvimento. Embora desempenhem um papel nos processos de biotransformação, algumas enzimas, como a GST, também atuam no processo de desintoxicação do corpo, catalisando a conjugação do GSH a uma ampla variedade de compostos eletrolíticos. Mesmo em concentrações subletais, esse sistema enzimático está diretamente ligado à suscetibilidade do organismo aos xenobióticos [34, 36, 44, 46, 51, 60–62, 65, 66].

Conforme detalhado na Tabela 1, as seguintes enzimas foram usadas como alvos em estudos de atividade enzimática: ChE (n=13), GST (n=12), CAT (n=11), SOD (n=8), GPx (n=5), glutatona redutase (GSH) (n=3), POD (n=2), CbE (n=2), HPS (n=2), Caspase 3 (n=1), Lactato desidrogenase (LDH) (n=1) e TrxR (n=1), com consequente aumento ou diminuição da

atividade [24, 25, 29, 31, 32, 34, 36, 40, 44, 49–52, 60–62, 64–68]. Embora outras enzimas possam estar envolvidas em respostas genotóxicas, a ChE é comumente estudada em ecotoxicologia, principalmente em animais que se alimentam por filtração, como *Artemia* e *Daphnia*, e, portanto, é refletida no maior número de estudos nesta revisão.

A importância de avaliação da atividade enzimática e de biomarcadores subletais em estudos ecotoxicológicos está na possibilidade de antecipar efeitos adversos no nível do organismo, incluindo processos de crescimento, reprodução e mortalidade. Em ecotoxicologia, muitos autores avaliaram mais de uma enzima simultaneamente, considerando suas diferentes funções para melhor avaliar o impacto ambiental. Devido às características das moléculas, o acoplamento enzimático pode não ocorrer ou pode ocorrer parcialmente nas diferentes enzimas, resultando em diferentes respostas, como inibição, aceleração ou nenhuma resposta.

Expressão gênica

Uma grande variedade de genes foi usada como alvos em estudos de expressão gênica [26, 27, 30, 33, 48, 51], como hsp70 (n=5), TCP contendo chaperonina (tcp) (n=3), (hsp26) (n=3), hsp60 (n=2), HAD-like (n=2), UCP2 (n=2), CDC48 (n=2), coxI (n=2), coxIII (n=2), clap (n=2), cstb (n=2), sod (n=1), gst (n=1), peroxinectina (pxn) (n=1), lgbp (n=1), dscam (n=1), proPO (n=1) e hmgb (n=1), com um aumento ou redução da inexpressão resultante. Cinco estudos [27, 30, 33, 48, 51] utilizaram a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para quantificar a expressão gênica, e apenas um estudo [26] utilizou a técnica de eletroforese combinada com western blot.

Geralmente, a seleção de genes a serem avaliados no teste de genotoxicidade depende principalmente do estágio de vida do organismo (adultos ou náuplios). Para adultos, genes como hsp26, hsp60, hsp70, coxI e coxIII são comumente relacionados à resposta do corpo ao estresse. Quanto aos náuplios, genes como cstb, TPC, clap, HAD-like, UCP2 e CDC48 são comumente relacionados ao desenvolvimento e diferenciação do organismo [26, 27, 30, 48, 51, 70]. Além disso, genes como sod, gst, pxn, lgbp, dscam, proPO e hmgb são alvos potenciais para serem usados em náuplios e adultos, pois estão relacionados ao sistema imunológico da *Artemia*. [33]

Algumas substâncias podem não expressar respostas agudas em modelos biológicos, mas podem estimular a expressão gênica. Por exemplo, a exposição de *A. salina* a células de algas *Alexandrium minutum* ou à toxina Gonyautoxina 2/3 (GTX2/3) alterou a expressão gênica do complexo ribonucleoproteico e o metabolismo de aminoácidos e lipídios [28].

Esses estudos evidenciaram que a superexpressão desses genes pode desempenhar um papel protetor na *A. salina*. Ao mesmo tempo, a exposição à toxina GTX2/3 pode inibir a expressão de genes relacionados ao metabolismo da quitina, interrompendo o processo de muda ou morfogênese. Outros estudos com um modelo biológico do mesmo nível trófico usando *Daphnia magna* corroboram as possíveis alterações genômicas resultantes da exposição crônica a xenobióticos, alterando as atividades enzimáticas/metabólicas e proteômicas ligadas à mudança ou expressão gênica. A exposição de *D. magna* a biocidas de isotiazolinona mostrou efeitos deletérios em vários parâmetros e diferenças nos padrões de resposta, como reprodução, efeitos parenterais na primeira geração e efeitos cumulativos nas gerações subsequentes [88].

Danos no DNA

Em estudos sobre danos ao DNA [19, 20, 28, 37, 59] causados pela exposição à substância teste, três utilizaram eletroforese (ensaio cometa) e dois RT PCR como técnicas principais. Embora não apresentassem toxicidade aguda para larvas e adultos, após exposição à biotoxina Gonyautoxina, o sequenciamento do genoma de *A. salina* revelou alterações em 254 genes e seu transcriptome [28]. A exposição a ambos indicou a expressão do gene hsp70 e outros relacionados ao estresse oxidativo, regulando positivamente enzimas que metabolizam ácidos graxos para produção de energia. A toxina em particular afetou o metabolismo da quitina, uma importante proteína relacionada à morfogênese, levando a uma possível perda da resistência da *A. salina* às florações de fitoplâncton [28]. Os autores inferiram correlações entre desenvolvimento, fertilidade, fecundidade, viabilidade e efeitos da substância de teste por meio da análise de DNA. Um resultado semelhante com a exposição de *D. magna* ao organofosforado malation em doses subletais promoveu quebras de fita de DNA detectadas por meio do ensaio cometa [89].

Danos ao DNA causados por nanopartículas de Ag são diretamente proporcionais à concentração e causam um maior grau de apoptose [59]. Danos dessa natureza podem limitar o desenvolvimento de náuplios, com malformações ou deficiências enzimáticas. Como esperado, o tempo de exposição também contribui para maiores danos ao DNA [20, 37]. A exposição ao metanossulfonato de etila em diferentes níveis mostrou uma proporcionalidade de danos de acordo com o tempo de exposição tanto em *A. franciscana* quanto em *A. parthenogenica* [20], enquanto os pesticidas triclosan e triclocarban causaram o mesmo efeito em *A. salina* submetida à exposição entre 0 e 24 horas [37].

Na pesquisa genotóxica, estudos que tenham mostrado alterações no DNA em gerações futuras devem ser encorajados, uma vez que a expressão gênica pode ser apenas uma resposta a um estímulo externo e não representar uma mudança no genoma capaz de se perpetuar. A exposição ao etilmetano sulfonato mostrou que houve persistência genotóxica na primeira geração da *A. salina* e até na segunda geração da *A. parthenogenica*, demonstrando a capacidade de indivíduos com reprodução sexuada de recuperar a homeostase mais rapidamente [19]. Assim, para fins comparativos entre exposição e não exposição a xenobióticos, esses testes são de extrema importância e fortemente recomendados, principalmente em testes de ecotoxicidade crônica.

Atividade metabólica

Ao contrário da expressão genética, da atividade enzimática e dos ensaios de danos ao DNA, a atividade metabólica foi explorada por apenas um estudo incluído nesta revisão [28]. Neste estudo, biomarcadores de atividade metabólica estavam envolvidos no processo metabólico de quitina, glucosamina, aminoglicosídeos e amino açúcares. A exposição à biotoxina Gonyautoxina restringiu a atividade enzimática relacionada nessas vias metabólicas [28]. A exposição ao herbicida Roundup® (100 ppm) alterou significativamente as vias metabólicas essenciais para manter o equilíbrio homeostático de *A. franciscana*, alterando as concentrações de aspartato, betaína, tirosina, fenilalanina, treonina, isoleucina, formato, gadusol e glicose. Além disso, algumas evidências mostraram que mudanças nas vias metabólicas após a exposição ao Roundup® também podem modificar o metabolismo de aminoácidos, carboidratos, metabolismo energético, vitaminas e biossíntese de metabólitos secundários [63].

Genotoxicidade em Artemia

Em relação aos estudos que avaliaram o potencial de dano genético causado por nanopartículas (NPs) em *Artemia*, as NPs de prata danificaram diretamente o DNA em náuplios [59]. O poliestireno catiônico modificado com NPs de amino, negro de fumo e poliestireno também mostrou um aumento na expressão dos genes *clap*, *ctsb*, *hsp26*, *hsp70* ou *tcp* em náuplios [26, 27, 51]. Quanto às enzimas ChE, CAT, CbE, GST e SOD, estudos mostraram uma redução em sua atividade após exposição a NPs de polipropileno, poliestireno, cério, cádmio, zinco, cobre e óxido de grafeno [34, 44, 46, 51, 62, 65].

Embora alguns estudos tenham relatado uma atividade menor de algumas enzimas, a maioria dos estudos mostrou uma atividade maior das enzimas CAT, ChE, GPx, GSH, GST, GPx, HSP e SOD após exposição a NPs de óxido de grafeno, polipropileno, cobre, cério, prata carregada de O-carboximetilquitosana, cádmio, zinco, cobre, ferro e óxido de grafeno [34, 40, 44, 46, 51, 52, 60–62, 65, 68].

Em alguns casos, a mesma substância, como o NP de cádmio, aumenta e reduz a atividade enzimática, dependendo do estágio de vida do organismo. Para os náuplios, essa substância reduziu a atividade da CAT [62] enquanto aumentou a atividade dessa enzima em adultos [40].

Muitas das alterações genéticas em camarões de salmoura causadas por xenobióticos interferem nas vias moleculares relacionadas a enzimas essenciais para o desenvolvimento e a sobrevivência. A exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos mostrou alterações significativas na expressão gênica de hsp26, hsp60, hsp70, coxI e coxIII na *A. franciscana* [30, 70]. Nanopartículas de poliestireno alteram a expressão gênica e o funcionamento de ChE, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina, CbE, responsável pela desintoxicação e metabolismo de substâncias endógenas como hormônios, HSP70, CAT e GST responsáveis pela redução do estresse oxidativo por meio da degradação de H₂O₂ [51]. Algumas dessas alterações podem causar mudanças hereditárias que podem ser revertidas ao longo de gerações, especialmente em espécies que se reproduzem sexualmente [19, 20].

Esta revisão revelou uma variação metodológica considerável em ensaios de genotoxicidade usando *Artemia* como modelo biológico. Portanto, as informações primárias sobre ensaios de genotoxicidade com *Artemia* em estudos de ecotoxicidade são resumidas e mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Compilação de resultados envolvendo genes e enzimas em testes de genotoxicidade utilizando *Artemia*

Requerimentos	Náuplio	Jovem	Adulto
Biomarcadores	CbE	CbE	CbE
(Atividade enzimática):	CAT	CAT	CAT
	ChE	ChE	ChE
	GPx	GPx	GPx
	GSH	GSH	GSH
	GST	GST	GST
	LDH	LDH	LDH
	POD	POD	POD

	HSP SOD TrxR	HSP SOD TrxR	HSP SOD TrxR
Biomarcadores (expressão gênica):	estb TPC clap HAD-like UCP2 CDC48 sod gst pxn lgbp dscam proPO hmgb	hsp26 hsp60 hsp70 coxI coxIII sod gst pxn lgbp dscam proPO hmgb	hsp26 hsp60 hsp70 coxI coxIII sod gst pxn lgbp dscam proPO hmgb
Condições do ensaio			
Amostra analisada:	Organismo	Organismo	Organismo
Tempo de exposição:	48 horas (acute) 21 dias (chronic)	48 horas (acute) 21 dias (chronic)	48 horas (acute) 21 dias (chronic)
Forma de exposição:	Placas com poços	Tubos	Copos
Material:	Plástico	Plástico or vidro	Vidro
Meio de exposição:	Água do mar reconstituída	Água do mar reconstituída	Água do mar reconstituída
Salinidade:	34 ± 4 mg/L	34 ± 4 mg/L	34 ± 4 mg/L
Volume:	0.1 mL/indivíduo	1.0 mL/indivíduo	1.5 mL/indivíduo
Temperatura:	25 ± 4 °C	25 ± 4 °C	25 ± 4 °C
Fotoperíodo:	16/8 horas (claro/escuro)	16/8 horas (claro/escuro)	16/8 horas (claro/escuro)
Replicatas:	3	3	3
Tamnhno da amostra por replicata:	200	15	10
Controle Negativo:	Água do mar reconstituída	Água do mar reconstituída	Água do mar reconstituída
Tempo de vida:	< 24 horas	7 – 14 dias	16 – 28 dias
Critério de aceitação:	Controle da mortalidade < 10%	Controle da mortalidade < 10%	Controle da mortalidade < 10%

Legenda: GE – Genotoxicidade; EA – Atividade enzimática; ME – Atividade metabólica; ALDH – Aldeído desidrogenase; CAT – Catalase; CbE – Carboxilesterase - CDC48 – *Controle da divisão celular proteína 48*; ChE – Colinesterase – clap – Proteína associada a *Catepsina L*; coxI - *cicloxigenase I*; coxIII - *cicloxigenase III*; cstb – Inibidor da *cistatina B* ; dscam -

molécula de adesão celular da síndrome de down – GHS – Glutationa redutase; GPx – Glutationa peroxidase; GST - Glutationa S-Transferase; HAD-like - *haloácido desalogenase*; hmgb - caixa de proteína de grupo de alta mobilidade; Hsp70 - *70-kDa proteína de choque térmico*; LDH – Lactato desidrogenase; lgbp – lipopolissacarídeo e β -1,3-glucano-proteína de ligação; POD – Peroxidase; proPO – Profenoloxidase; pxn – Peroxinectina; SOD - Superóxido dismutase; TrxR - Tioredoxina redutase; UCP2 – *Proteína de desacoplamento 2*

Limitações do estudo

Um estudo de revisão é uma das melhores maneiras de resumir e sintetizar as evidências disponíveis sobre um determinado tópico, como estudos ecotoxicológicos usando *Artemia* em ensaios de genotoxicidade. No entanto, algumas limitações precisam ser consideradas, como (i) restrições de idioma: esta revisão que foi limitada a artigos publicados em inglês, o que pode excluir trabalhos publicados exclusivamente em outros idiomas; (ii) restrições de tempo: a busca foi limitada a um período (até julho de 2023) e pode não ter incluído estudos publicados entre o período de triagem e publicação; (iii) restrições de escopo: a busca foi restrita às bases de dados Web of Science, SCOPUS, Embase e PubMed; (iv) viés de publicação: há uma tendência maior de publicar estudos com resultados positivos e significativos, o que pode levar a uma tendência à publicação seletiva e, conseqüentemente, à tendência ao uso de biomarcadores específicos (como Carboxilesterase); por fim, a (v) heterogeneidade dos estudos: os trabalhos incluídos nesta revisão têm diferentes espécies, intervenções, tempo de exposição e classificação de matriz, o que dificulta as correlações dos resultados.

Considerações finais

A partir dos dados obtidos neste estudo, observamos que a *Artemia* é um modelo apropriado para avaliar a ecotoxicidade de diferentes tipos de substâncias químicas por meio de testes de genotoxicidade. A possibilidade de monitorar organismos em níveis tróficos inferiores por meio de metabólitos e atividades enzimáticas amplia a avaliação de impactos ambientais, especialmente em ecossistemas costeiros. Além disso, novos métodos para análises proteômicas, metabolômicas e transcriptômicas trazem outro patamar para as avaliações ecotoxicológicas.

A falta de padronização observada entre os estudos incluídos nesta revisão quanto ao delineamento experimental, tamanho amostral, número de repetições, temperatura, tempo de exposição, fotoperíodo, idade e número de concentrações se deve aos diferentes tipos de

enzimas, vias metabólicas e expressão de genes avaliados. Variações nos métodos utilizados nos testes de genotoxicidade reforçam a necessidade de desenvolver mais estudos para padronizar protocolos com *Artemia*.

Por fim, gostaríamos de destacar as inúmeras vantagens citadas na utilização deste modelo em estudos ecotoxicológicos, como a possibilidade de monitorar alterações bioquímicas, utilizando metodologias já consolidadas, que podem sugerir alterações genotóxicas. Destacamos também tecnologias inovadoras como a análise transcriptômica e metabolômica, que começam a ser utilizadas em estudos ecotoxicológicos, bem como estudos ao longo de gerações sucessivas para identificar alterações no DNA e consequentemente na expressão gênica.

Perspectivas

O microcrustáceo de água salgada *Artemia* tem sido usado em testes de genotoxicidade por pelo menos duas décadas. Apesar do uso crescente do organismo como modelo biológico em estudos de ecotoxicidade, e com base nos dados desta revisão, várias lacunas merecem atenção e investigação, como:

- 1) Estabelecer especificações robustas que permitam interpretar os resultados dos testes descrevendo as principais alterações de genotoxicidade (atividade enzimática e expressão gênica).
- 2) Expandir o escopo dos testes de genotoxicidade usando análises metabolômicas, proteômicas e transcriptômicas.
- 3) Conduzir estudos ecotoxicológicos usando a mesma substância de teste para comparar dados entre *Artemia* e outro modelo biológico compatível, como *Daphnia magna*.
- 4) Produzir novos estudos ecotoxicológicos com testes de genotoxicidade usando poluentes emergentes, principalmente novos medicamentos, pesticidas e nanopartículas.

Considerações éticas

A bioética em pesquisa engloba diversos princípios que visam utilizar o conhecimento científico e os valores éticos corretamente. Propostos em 1992 por Russell & Burch, os 3Rs (redução, refinamento e substituição) visam reduzir o número de animais, minimizar sua dor e desconforto e fornecer alternativas para substituir os testes in vivo. A utilização da *Artemia* como modelo biológico em pesquisa reduz impasses quanto aos aspectos éticos envolvendo

animais sencientes, pois são classificados como organismos não protegidos, caracterizando o conceito de “substituição” proposto pela ideia dos 3Rs. Portanto, diversas questões ainda precisam ser debatidas, como o cumprimento dos princípios bioéticos e a redução do número de organismos em testes laboratoriais sem necessariamente afetar os resultados da pesquisa.

Declaração de conflitos

Nenhum potencial conflito de interesses foi relatado pelo(s) autor(es).

Financiamento

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, projeto APQ-02426-21.

Declaração de disponibilidade de dados

Os autores confirmam que os dados que sustentam as conclusões deste estudo estão disponíveis no artigo.

Referências

- [1] Nunes, B. S.; Carvalho, F. D.; Guilhermino, L. M.; Van Stappen, G. Use of the Genus *Artemia* in Ecotoxicity Testing. *Environ. Pollut.*, **2006**, *144* (2), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>.
- [2] Ntungwe, N. E.; Domínguez-martín, E. M.; Roberto, A.; Tavares, J.; Isca, V. M. S. *Artemia* Species: *Curr. Pharm. Des.*, **2020**, *26* (24), 2892–2908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>.
- [3] Lenormand, T.; Nougé, O.; Jabbour-Zahab, R.; Arnaud, F.; Dezileau, L.; Chevin, L. M.; Sánchez, M. I. Resurrection Ecology in *Artemia*. *Evol. Appl.*, **2018**, *11* (1), 76–87. <https://doi.org/10.1111/eva.12522>.
- [4] Albarano, L.; Ruocco, N.; Lofrano, G.; Guida, M.; Libralato, G. Genotoxicity in *Artemia* Spp.: An Old Model with New Sensitive Endpoints. *Aquat. Toxicol.*, **2022**, *252* (September), 106320. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106320>.
- [5] Abatzopoulos, T. J.; Kappas, I.; Bossier, P.; Sorgeloos, P.; Beardmore, J. A. Genetic Characterization of *Artemia Tibetiana* (Crustacea: Anostraca). *Biol. J. Linn. Soc.*, **2002**, *75* (3), 333–344. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00023.x>.
- [6] APAT-IRSA-CNR. Metodo 8060. Metodo Di Valu-Tazione Della Tossicità Acuta Con *Artemia* Sp. *APAT-IRSA-CNR, Metod. Anal. per le acque, Manuali e Linee Guid.* *29/2003*, **2003**, *Terzo*, 1043–1049.

- [7] Némětová, Z.; Honek, D.; Kohnová, S.; Hlavčová, K.; Šulc Michalková, M.; Sočuvka, V.; Velísková, Y. Validation of the EROSION-3D Model through Measured Bathymetric Sediments. *Water*. 2020. <https://doi.org/10.3390/w12041082>.
- [8] Kellogg, V. L. A NEW ARTEMIA AND ITS LIFE CONDITIONS. *Science*, **1906**, *24* (619), 594–596. <https://doi.org/10.1126/science.24.619.594-b>.
- [9] Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M. Artemia Salina as a Test Organism for Bioassay. *Science*, **1956**, *123* (3194), 464. <https://doi.org/10.1126/science.123.3194.464>.
- [10] Barigozzi, C. [On the geographical distribution of Artemia salina Leach mutants]. *Arch. Julius Klaus. Stift. Vererbungsforsch. Sozialanthropol. Rassenhyg.*, **1946**, *21* (3–4), 479–482.
- [11] Boone, E.; Baas-Becking, L. G. SALT EFFECTS ON EGGS AND NAUPLII OF ARTEMIA SALINA L. *J. Gen. Physiol.*, **1931**, *14* (6), 753–763. <https://doi.org/10.1085/jgp.14.6.753>.
- [12] Fautrez-Firlefyn, N.; Fautrez, J. Intranuclear Proteins of the Oocytes in Artemia Salina L. *Nature*, **1953**, *172* (4369), 163–164. <https://doi.org/10.1038/172163a0>.
- [13] Gilchrist, B. M. Haemoglobin in Artemia. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.*, **1954**, *143* (910), 136–146. <https://doi.org/10.1098/rspb.1954.0059>.
- [14] Weisz, P. B. The Histological Pattern of Metameric Development in Artemia Salina. *J. Morphol.*, **1947**, *81* (1), 45–95. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050810103>.
- [15] Duračková, Z.; Betina, V.; Horníková, B.; Nemeč, P. Toxicity of Mycotoxins and Other Fungal Metabolites to Artemia Salina Larvae. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infekt. und Hyg. Zweite naturwissenschaftliche Abt. Allg. Landwirtsch. und Tech. Mikrobiol.*, **1977**, *132* (4), 294–299. [https://doi.org/10.1016/s0044-4057\(77\)80017-8](https://doi.org/10.1016/s0044-4057(77)80017-8).
- [16] Macrì, A.; Stazi, A. V.; Dojmi di Delupis, G. Acute Toxicity of Furazolidone on Artemia Salina, Daphnia Magna, and Culex Pipiens Molestus Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1988**, *16* (2), 90–94. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(88\)90021-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(88)90021-8).
- [17] Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med.*, **1982**, *45* (5), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- [18] Dojmi Di Delupis, G.; Rotondo, V. Phototaxis in Aquatic Invertebrates: Possible Use in Ecotoxicity Tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1988**, *16* (3), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(88\)90049-8](https://doi.org/10.1016/0147-6513(88)90049-8).
- [19] Sukumaran, S.; Grant, A. Effects of Genotoxicity and Its Consequences at the Population Level in Sexual and Asexual Artemia Assessed by Analysis of Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **2013**, *757* (1), 8–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.015>.
- [20] Sukumaran, S.; Grant, A. Differential Responses of Sexual and Asexual Artemia to Genotoxicity by a Reference Mutagen: Is the Comet Assay a Reliable Predictor of Population Level Responses? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2013**, *91*, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.012>.
- [21] Peixoto, D.; Amorim, J.; Pinheiro, C.; Oliva-Teles, L.; Varó, I.; de Medeiros Rocha, R.; Vieira, M. N. Uptake and Effects of Different Concentrations of Spherical Polymer Microparticles on Artemia Franciscana. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2019**, *176*, 211–218.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.100>.
- [22] Mirzaei VandKhanghah, M.; Hedayati, A.; Nazeri, S.; Mohammadi Azarm, H.; Ghorbani, R. Biomagnification of Copper Along the Aquatic Food Chain (*Artemia Franciscana*, *Danio Rerio*, and *Astronotus Ocellatus*). *Biol. Trace Elem. Res.*, **2022**, *200* (4), 1854–1860. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02781-4>.
- [23] Kim, L.; Cui, R.; Kwak, J. Il; An, Y.-J. Sub-Acute Exposure to Nanoplastics via Two-Chain Trophic Transfer: From Brine Shrimp *Artemia Franciscana* to Small Yellow Croaker *Larimichthys Polyactis*. *Mar. Pollut. Bull.*, **2022**, *175*, 113314. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113314>.
- [24] Varó, I.; Navarro, J. C.; Amat, F.; Guilhermino, L. Characterisation of Cholinesterases and Evaluation of the Inhibitory Potential of Chlorpyrifos and Dichlorvos to *Artemia Salina* and *Artemia Parthenogenetica*. *Chemosphere*, **2002**, *48* (6), 563–569. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(02\)00075-9](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00075-9).
- [25] Beattie, K. A.; Ressler, J.; Wiegand, C.; Krause, E.; Codd, G. A.; Steinberg, C. E. W.; Pflugmacher, S. Comparative Effects and Metabolism of Two Microcystins and Nodularin in the Brine Shrimp *Artemia Salina*. *Aquat. Toxicol.*, **2003**, *62* (3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(02\)00091-7](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00091-7).
- [26] Rodd, A. L.; Creighton, M. A.; Vaslet, C. A.; Rangel-Mendez, J. R.; Hurt, R. H.; Kane, A. B. Effects of Surface-Engineered Nanoparticle-Based Dispersants for Marine Oil Spills on the Model Organism *Artemia Franciscana*. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, *48* (11), 6419–6427. <https://doi.org/10.1021/es500892m>.
- [27] Bergami, E.; Pugnali, S.; Vannuccini, M. L.; Manfra, L.; Faleri, C.; Savorelli, F.; Dawson, K. A.; Corsi, I. Long-Term Toxicity of Surface-Charged Polystyrene Nanoplastics to Marine Planktonic Species *Dunaliella Tertiolecta* and *Artemia Franciscana*. *Aquat. Toxicol.*, **2017**, *189*, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.008>.
- [28] Yi, X.; Zhang, K.; Liu, R.; Giesy, J. P.; Li, Z.; Li, W.; Zhan, J.; Liu, L.; Gong, Y. Transcriptomic Responses of *Artemia Salina* Exposed to an Environmentally Relevant Dose of *Alexandrium Minutum* Cells or Gonyautoxin2/3. *Chemosphere*, **2020**, *238*, 124661. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124661>.
- [29] Abushaala, N. M.; Elfituri, A. M.; Zulkifli, S. Z. Histological Study of Gonadal Tissues of Adult *Artemia Salina* (Linnaeus 1758) and Immunohistochemistry by Caspase 3 and HSP70 to Detect Specific Apoptosis Markers on Gonadal Tissues after Exposure to TBTCI. *Open Vet. J.*, **2021**, *11* (1), 112–120. <https://doi.org/10.4314/ovj.v11i1.17>.
- [30] Albarano, L.; De Rosa, I.; Santaniello, I.; Montuori, M.; Serafini, S.; Toscanesi, M.; Trifuoggi, M.; Lofrano, G.; Guida, M.; Libralato, G. Synergistic, Antagonistic, and Additive Effects of Naphthalene, Phenanthrene, Fluoranthene and Benzo(k)Fluoranthene on *Artemia Franciscana* Nauplii and Adult. *Environ. Pollut.*, **2023**, *335*, 122286. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122286>.
- [31] Albendín, M. G.; Aranda, V.; Coello, M. D.; González-Gómez, C.; Rodríguez-Barroso, R.; Quiroga, J. M.; Arellano, J. M. Pharmaceutical Products and Pesticides Toxicity Associated with Microplastics (Polyvinyl Chloride) in *Artemia Salina*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2021**, *18* (20). <https://doi.org/10.3390/ijerph182010773>.
- [32] Cavion, F.; Pelin, M.; Ponti, C.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Sosa, S. Ecotoxicological Impact of the Marine Toxin Palytoxin on the Micro-Crustacean *Artemia Franciscana*. *Mar. Drugs*, **2022**, *20* (2). <https://doi.org/10.3390/md20020081>.

- [33] Han, B.; Baruah, K.; Nguyen, D. V.; Williams, D. L.; Devriendt, B.; Cox, E.; Bossier, P. Beta-Glucan's Varying Structure Characteristics Modulate Survival and Immune-Related Genes Expression from *Vibrio Harveyi*-Infected *Artemia Franciscana* in Gnotobiotic Conditions. *Fish Shellfish Immunol.*, **2020**, *102*, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.062>.
- [34] Jeyavani, J.; Sibiya, A.; Bhavaniramy, S.; Mahboob, S.; Al-Ghanim, K. A.; Nisa, Z.-U.; Riaz, M. N.; Nicoletti, M.; Govindarajan, M.; Vaseeharan, B. Toxicity Evaluation of Polypropylene Microplastic on Marine Microcrustacean *Artemia Salina*: An Analysis of Implications and Vulnerability. *Chemosphere*, **2022**, *296*, 133990. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133990>.
- [35] Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L.; Cicero, A. M.; Manfra, L. A Review of Toxicity Testing Protocols and Endpoints with *Artemia* Spp. *Ecol. Indic.*, **2016**, *69*, 35–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>.
- [36] Comeche, A.; Martín-Villamil, M.; Picó, Y.; Varó, I. Effect of Methylparaben in *Artemia Franciscana*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **2017**, *199*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.04.004>.
- [37] Xu, X.; Lu, Y.; Zhang, D.; Wang, Y.; Zhou, X.; Xu, H.; Mei, Y. Toxic Assessment of Triclosan and Triclocarban on *Artemia Salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2015**, *95* (6), 728–733. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1641-2>.
- [38] Danabas, D.; Ates, M.; Ertit Tastan, B.; Cicek Cimen, I. C.; Unal, I.; Aksu, O.; Kutlu, B. Effects of Zn and ZnO Nanoparticles on *Artemia Salina* and *Daphnia Magna* Organisms: Toxicity, Accumulation and Elimination. *Sci. Total Environ.*, **2020**, *711*, 134869. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134869>.
- [39] Frías-Espéricueta, M. G.; Soto-Jiménez, M. F.; Abad-Rosales, S. M.; López-Morales, M. L.; Trujillo-Alvarez, S. Y.; Arellano-Sarabia, J. A.; Quintero-Alvarez, J. M.; Osuna-López, J. I.; Bojórquez, C.; Aguilar-Juárez, M. Physiological and Histological Effects of Cadmium, Lead, and Combined on *Artemia Franciscana*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **2022**, *29* (5), 7344–7351. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16147-9>.
- [40] Mohamed, A. H.; Sheir, S. K.; Osman, G. Y.; Abd-El Azeem, H. H. Toxic Effects of Heavy Metals Pollution on Biochemical Activities of the Adult Brine Shrimp, *Artemia Salina*. *Can. J. Pure Appl. Sci.*, **2014**, *8* (3), 3019–3028.
- [41] Ñañez Pacheco, G. K.; Sanabio Maldonado, N. S.; Pastrana Alta, R. Y.; Aguilar Vitorino, H. Short Exposure of *Artemia Salina* to Group-12 Metals: Comparing Hatchability, Mortality, Lipid Peroxidation, and Swimming Speed. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2021**, *213*, 112052. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112052>.
- [42] Palácio, S. M.; de Almeida, J. C. B.; de Campos, É. A.; Veit, M. T.; Ferreira, L. K.; Deon, M. T. M. Silver Nanoparticles Effect on *Artemia Salina* and *Allium Cepa* Organisms: Influence of Test Dilution Solutions on Toxicity and Particles Aggregation. *Ecotoxicology*, **2021**, *30* (5), 836–850. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02393-7>.
- [43] Bhuvaneshwari, M.; Thiagarajan, V.; Nemade, P.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Toxicity and Trophic Transfer of P25 TiO₂ NPs from *Dunaliella Salina* to *Artemia Salina*: Effect of Dietary and Waterborne Exposure. *Environ. Res.*, **2018**, *160*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.022>.
- [44] Madhav, M. R.; David, S. E. M.; Kumar, R. S. S.; Swathy, J. S.; Bhuvaneshwari, M.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Toxicity and Accumulation of Copper Oxide

- (CuO) Nanoparticles in Different Life Stages of *Artemia Salina*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2017**, *52*, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.03.013>.
- [45] Rajabi, S.; Ramazani, A.; Hamidi, M.; Naji, T. *Artemia Salina* as a Model Organism in Toxicity Assessment of Nanoparticles. *Daru*, **2015**, *23* (1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>.
- [46] Zhu, S.; Luo, F.; Chen, W.; Zhu, B.; Wang, G. Toxicity Evaluation of Graphene Oxide on Cysts and Three Larval Stages of *Artemia Salina*. *Sci. Total Environ.*, **2017**, *595*, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.224>.
- [47] Borba, F.; Leichtweis, J.; Bueno, F.; Pellenz, L.; Inticher, J.; Seibert, D. Pollutant Removal and Acute Toxicity Assessment (*Artemia Salina*) of Landfill Leachate Treated by Photo-Fenton Process Mediated by Oxalic Acid. *J. Water Process Eng.*, **2019**, *28*, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.01.017>.
- [48] Albarano, L.; Toscanesi, M.; Trifuoggi, M.; Guida, M.; Lofrano, G.; Libralato, G. In Situ Microcosm Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons: Influence and Effectiveness of Nano-Zero Valent Iron and Activated Carbon. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **2023**, *30* (2), 3235–3251. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22408-y>.
- [49] Lee, D.-H.; Eom, H.-J.; Kim, M.; Jung, J.-H.; Rhee, J.-S. Non-Target Effects of Antifouling Agents on Mortality, Hatching Success, and Acetylcholinesterase Activity in the Brine Shrimp *Artemia Salina*. *Toxicol. Environ. Health Sci.*, **2017**, *9*, 237–243. <https://doi.org/10.1007/s13530-017-0326-0>.
- [50] Varó, I.; Redón, S.; Garcia-Roger, E. M.; Amat, F.; Guinot, D.; Serrano, R.; Navarro, J. C. Aquatic Pollution May Favor the Success of the Invasive Species *A. Franciscana*. *Aquat. Toxicol.*, **2015**, *161*, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.008>.
- [51] Varó, I.; Perini, A.; Torreblanca, A.; Garcia, Y.; Bergami, E.; Vannuccini, M. L.; Corsi, I. Time-Dependent Effects of Polystyrene Nanoparticles in Brine Shrimp *Artemia Franciscana* at Physiological, Biochemical and Molecular Levels. *Sci. Total Environ.*, **2019**, *675*, 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.157>.
- [52] Cavion, F.; Fusco, L.; Sosa, S.; Manfrin, C.; Alonso, B.; Zurutuza, A.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Prato, M.; Pelin, M. Ecotoxicological Impact of Graphene Oxide: Toxic Effects on the Model Organism *Artemia Franciscana*. *Environ. Sci. Nano*, **2020**, *7* (11), 3605–3615. <https://doi.org/10.1039/D0EN00747A>.
- [53] Jha, A. N. Ecotoxicological Applications and Significance of the Comet Assay. *Mutagenesis*, **2008**, *23* (3), 207–221. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen014>.
- [54] De Vos, S.; Van Stappen, G.; Sorgeloos, P.; Vuylsteke, M.; Rombauts, S.; Bossier, P. Identification of Salt Stress Response Genes Using the *Artemia* Transcriptome. *Aquaculture*, **2019**, *500*, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.067>.
- [55] Huylmans, A. K.; Troups, M. A.; Macon, A.; Gammerdinger, W. J.; Vicoso, B. Sex-Biased Gene Expression and Dosage Compensation on the *Artemia Franciscana* Z-Chromosome. *Genome Biol. Evol.*, **2019**, *11* (4), 1033–1044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz053>.
- [56] Yu, J.; Lu, Y. *Artemia* Spp. Model - A Well-Established Method for Rapidly Assessing the Toxicity on an Environmental Perspective. *Med. Res. Arch. Vol 6 No 2 Vol.6 Issue 2 Febr. 2018*, **2018**. <https://doi.org/10.18103/mra.v6i2.1700>.
- [57] Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D. G. Preferred Reporting Items for

- Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Open Med.*, **2009**, *3* (3), e123-30.
- [58] Ouzzani, M.; Hammady, H.; Fedorowicz, Z.; Elmagarmid, A. Rayyan-a Web and Mobile App for Systematic Reviews. *Syst. Rev.*, **2016**, *5* (1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>.
- [59] Arulvasu, C.; Jennifer, S. M.; Prabhu, D.; Chandhirasekar, D. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles in Brine Shrimp Artemia. *ScientificWorldJournal.*, **2014**, *2014*, 256919. <https://doi.org/10.1155/2014/256919>.
- [60] Cimen, I. C. C.; Danabas, D.; Ates, M. Comparative Effects of Cu (60-80 Nm) and CuO (40 Nm) Nanoparticles in Artemia Salina: Accumulation, Elimination and Oxidative Stress. *Sci. Total Environ.*, **2020**, *717*, 137230. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137230>.
- [61] Demarchi, C. A.; da Silva, L. M.; Niedźwiecka, A.; Ślawska-Waniewska, A.; Lewińska, S.; Dal Magro, J.; Fossá Calisto, J. F.; Martello, R.; Rodrigues, C. A. Nanoecotoxicology Study of the Response of Magnetic O-Carboxymethylchitosan Loaded Silver Nanoparticles on Artemia Salina. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2020**, *74*, 103298. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103298>.
- [62] Kukavica, B.; Davidović-Plavšić, B.; Savić, A.; Dmitrović, D.; Šukalo, G.; Đurić-Savić, S.; Vučić, G. Oxidative Stress and Neurotoxicity of Cadmium and Zinc on Artemia Franciscana. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2023**, *201* (5), 2636–2649. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03352-x>.
- [63] Morgan, M. A.; Griffith, C. M.; Dinges, M. M.; Lyon, Y. A.; Julian, R. R.; Larive, C. K. Evaluating Sub-Lethal Stress from Roundup® Exposure in Artemia Franciscana Using 1H NMR and GC-MS. *Aquat. Toxicol.*, **2019**, *212*, 77–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.023>.
- [64] Sirdaarta, J.; Cock, I. E. Effect of Aloe Barbadensis Miller Juice on Oxidative Stress Biomarkers in Aerobic Cells Using Artemia Franciscana as a Model. *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, **2010**, *24* (3), 360–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ptr.2946>.
- [65] Sugantharaj David, E. M. D.; Madurantakam Royam, M.; Rajamani Sekar, S. K.; Manivannan, B.; Jalaja Soman, S.; Mukherjee, A.; Natarajan, C. Toxicity, Uptake, and Accumulation of Nano and Bulk Cerium Oxide Particles in Artemia Salina. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **2017**, *24* (31), 24187–24200. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9975-4>.
- [66] Tapia-Salazar, M.; Diaz-Sosa, V. R.; Cárdenas-Chávez, D. L. Toxicological Effect and Enzymatic Disorder of Non-Studied Emerging Contaminants in Artemia Salina Model. *Toxicol. reports*, **2022**, *9*, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.01.007>.
- [67] Rao, J. V.; Kavitha, P.; Jakka, N. M.; Sridhar, V.; Usman, P. K. Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp, Artemia Salina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2007**, *53* (2), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0226-9>.
- [68] Wang, C.; Jia, H.; Zhu, L.; Zhang, H.; Wang, Y. Toxicity of α -Fe₂O₃ Nanoparticles to Artemia Salina Cysts and Three Stages of Larvae. *Sci. Total Environ.*, **2017**, *598*, 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.183>.

- [69] Zhu, S.; Xue, M.-Y.; Luo, F.; Chen, W.-C.; Zhu, B.; Wang, G.-X. Developmental Toxicity of Fe(3)O(4) Nanoparticles on Cysts and Three Larval Stages of *Artemia Salina*. *Environ. Pollut.*, **2017**, *230*, 683–691. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.065>.
- [70] Albarano, L.; Serafini, S.; Toscanesi, M.; Trifuoggi, M.; Zupo, V.; Costantini, M.; Vignati, D. A. L.; Guida, M.; Libralato, G. Genotoxicity Set Up in *Artemia Franciscana* Nauplii and Adults Exposed to Phenanthrene, Naphthalene, Fluoranthene, and Benzo(k)Fluoranthene. *Water (Switzerland)*, **2022**, *14* (10). <https://doi.org/10.3390/w14101594>.
- [71] Abatzopoulos, T.; Beardmor, J.; Clegg, J.; Sorgeloos, P. *Artemia: Basic and Applied Biology*, Volume 1.; Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2002.
- [72] Sorgeloos, P.; Remiche-Van Der Wielen, C.; Persoone, G. The Use of *Artemia* Nauplii for Toxicity Tests-A Critical Analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **1978**, *2* (3–4), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(78\)80003-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(78)80003-7).
- [73] Ale, A.; Gutierrez, M. F.; Rossi, A. S.; Bacchetta, C.; Desimone, M. F.; Cazenave, J. Ecotoxicity of Silica Nanoparticles in Aquatic Organisms : An Updated Review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2021**, *87* (June), 103689. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103689>.
- [74] Bundschuh, M.; Filser, J.; Lüderwald, S.; Mckee, M. S.; Metreveli, G.; Schaumann, G. E.; Schulz, R.; Wagner, S. Nanoparticles in the Environment : Where Do We Come from , Where Do We Go To ? *Environ. Sci. Eur.*, **2018**. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>.
- [75] Boros, B. Evaluation of Ecotoxicology Assessment Methods of Nanomaterials and Their Effects. **2020**, 2019.
- [76] Kelpsiene, E.; Ekvall, M. T.; Lundqvist, M.; Torstensson, O.; Hua, J.; Cedervall, T. Environmental Science Processes & Impacts Polystyrene Nanoparticles †. **2022**, *100*, 8–16. <https://doi.org/10.1039/d1em00375e>.
- [77] Joseph, T. M.; Mahapatra, D. K.; Esmaceli, A.; Piszczyk, Ł.; Hasanin, M. S.; Kattali, M.; Haponiuk, J.; Thomas, S. Nanoparticles : Taking a Unique Position in Medicine. **2023**.
- [78] Okey-onyesolu, C. F.; Hassanisaadi, M.; Bilal, M. Nanomaterials as Nanofertilizers and Nanopesticides : An Overview. **2021**, 8645–8663. <https://doi.org/10.1002/slct.202102379>.
- [79] Nunes, B. *The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology*; 2011; Vol. 212. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8453-1_2.
- [80] Pan, X.; Zhang, B. Identification of Stable Reference Genes for Toxicogenomic and Gene Expression Analysis. In *Environmental Toxicology and Toxicogenomics: Principles, Methods, and Applications*; Humana Press: Greenville, NC, 2021; pp 67–94.
- [81] Pfaffl, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29* (9). <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [82] Jemec, A.; Drobne, D.; Tišler, T.; Sepčić, K. Biochemical Biomarkers in Environmental Studies-Lessons Learnt from Enzymes Catalase, Glutathione S-Transferase and Cholinesterase in Two Crustacean Species. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2010**, *17* (3), 571–581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>.

- [83] Gutiérrez, O. A.; Chavez, M.; Lissi, E. A Theoretical Approach to Some Analytical Properties of Heterogeneous Enzymatic Assays. *Anal. Chem.*, **2004**, *76* (9), 2664–2668. <https://doi.org/10.1021/ac049885d>.
- [84] Bergami, E.; Bocci, E.; Vannuccini, M. L.; Monopoli, M.; Salvati, A.; Dawson, K. A.; Corsi, I. Nano-Sized Polystyrene Affects Feeding, Behavior and Physiology of Brine Shrimp *Artemia Franciscana* Larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2016**, *123*, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.021>.
- [85] Shcholak, T.; Eftekharpour, E. Insights into the Multifaceted Roles of Thioredoxin-1 System: Exploring Knockout Murine Models. *Biology (Basel)*., **2024**, *13* (3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/biology13030180>.
- [86] Tang, L.; Zhai, H.; Zhang, S.; Lv, Y.; Li, Y.; Wei, S.; Ma, P.; Wei, S.; Hu, Y.; Cai, J. Functional Characterization of Aldehyde Dehydrogenase in *Fusarium Graminearum*. *Microorganisms*, **2023**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122875>.
- [87] Ross, M. K.; Streit, T. M.; Herring, K. L.; Xie, S. Carboxylesterases: Dual Roles in Lipid and Pesticide Metabolism. *J. Pestic. Sci.*, **2010**, *35* (3), 257–264. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-07>.
- [88] Kim, J.; Choi, J. Trans- and Multigenerational Effects of Isothiazolinone Biocide CMIT/MIT on Genotoxicity and Epigenotoxicity in *Daphnia Magna*. *Toxics*, **2023**, *11* (4). <https://doi.org/10.3390/toxics11040388>.
- [89] Knapik, L. F. O.; Ramsdorf, W. Ecotoxicity of Malathion Pesticide and Its Genotoxic Effects over the Biomarker Comet Assay in *Daphnia Magna*. *Environ. Monit. Assess.*, **2020**, *192* (5). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8235-0>.

11 CONCLUSÃO GERAL

O entecavir não apresentou toxicidade aguda para os modelos biológicos *Aliivibrio fischeri*, *Microcystis novacekii*, *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. Assim, não foi possível estabelecer as CE₅₀, CI₅₀ ou CL₅₀ para os modelos. Os resultados sugerem especificidade do fármaco para a DNA polimerase do vírus VHB, de difícil interação com outras enzimas de diferentes organismos. Em virtude do alto custo do insumo, estudos de toxicidade crônica com os modelos biológicos utilizando *B. glabrata*, *A. salina* e *A. fischeri*, não puderam ser realizados. Esses estudos poderiam demonstrar as possíveis interações em vias metabólicas ou enzimáticas que que poderia colaborar com uma discussão mais aprofundada acerca do conhecimento ecotoxicológico do entecavir. Vale ressaltar que suas características físico químicas, sobretudo o baixo valor de Kow também pode contribuir para a baixa interação celular e molecular. Mesmo sem apresentar toxicidade, o fato de estar disponível no meio ambiente, o entecavir pode desencadear mecanismos de resistência em vírus e outros organismos. Por isso, o uso de tecnologias como o Fenton-like, que se mostrou promissor na remoção do entecavir, poderia diminuir esse risco. O uso de processo biológico com a *M. novacekii* para remoção do fármaco no meio aquoso não se mostrou eficiente, necessitando de mais estudos com outras cianobactérias, bactérias, fungos e leveduras, de forma individual ou associativa. Por fim, o estudo da genotoxicidade tendo como modelo a *Artemia* vem crescendo e ampliando suas aplicações. Diversas possibilidades de desfechos como alterações no DNA, expressão de enzimas, sobretudo nas relacionadas ao estresse oxidativo, análises proteômicas e metabolômicas podem ser utilizadas para avaliação do impacto ambiental por meio dos estudos ecotoxicológicos.

ANEXOS

A – Página de publicação do artigo 1

Research, Society and Development, v. 11, n. 10, e368111032975, 2022
 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32975>

Environmental elimination estimate and literature review of ecotoxicological aspects of the main widely used antiretrovirals in Brazil

Estimativa de eliminação no meio ambiente e revisão de literatura de aspectos ecotoxicológicos dos principais antirretrovirais mais utilizados no Brasil

Estimación de la eliminación en el medio ambiente y revisión de la literatura sobre aspectos ecotoxicológicos de los principales fármacos antirretrovirales más utilizados en Brasil

Received: 07/14/2022 | Reviewed: 07/24/2022 | Accept: 07/26/2022 | Published: 08/04/2022

Cléssius Ribeiro de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0884-1202>
 Federal University of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: cleciusrcq@gmail.com

Matheus de Freitas Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8603-1999>
 Federal University of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: matheusfribeiro@gmail.com

Miriam de Fátima Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9973-9603>
 Federal Center for Technological Education of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: mfsquimica2@gmail.com

Simone Furtado dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2060-5934>
 Federal University of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: simonefurtadofarmacutica@gmail.com

Cíntia Aparecida de Jesus Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3404-9059>
 Federal University of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: cintiajp@icb.ufmg.br

Marcos Paulo Gomes Mol

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2568-3579>
 Essequiel Days Foundation, Brazil
 E-mail: marcos_mol@yahoo.com.br

Micheline Rosa Silveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7002-4428>
 Federal University of Minas Gerais, Brazil
 E-mail: michelinesosa@gmail.com

Abstract

Objective: To estimate the consumption and quantity of unaltered antiretrovirals (ARV) eliminated into the environment and to carry out a literature research on aquatic ecotoxicological studies of ARV used in Brazil. **Methodology:** We requested from one of the ARV dispensing units in the city of Belo Horizonte (BH) the amount of ARV dispensed in the years 2018-2019-2020. Considering the amount dispensed in 2020, the daily dose, and the elimination rate, the amount of drug in unchanged form in the environment was estimated. For entire municipality of BH and Brazil, we used epidemiological data were used regarding individuals using antiretroviral therapy (ART) in 2020, the proportion of people living with HIV using the main ART regimen, following the same estimation methodology used previously. Structured and individual searches were carried out for each ARV used in Brazil, relating it to ecotoxicology, through Google Scholar, National Center for Biotechnology Information and Scifinder, in addition to the use of the *fass.se* platform. **Results:** Four articles presented results of acute or chronic toxicity in ecotoxicological models involving ARV. Dolutegravir and efavirenz were found to be highly toxic in ecotoxicological models. In 2020, approximately 2,167kg of ARVs in unchanged form were released into the environment in BH. In Brazil it was 112,274kg. **Conclusion:** It is urgent to quantify the main ARV in water bodies. With these data together with ecotoxicological data it will be possible to establish risk criteria for possible measures to control or mitigate these contaminants in the environment, especially actions to improve wastewater/water treatment.

Keywords: Antiretrovirals; Ecotoxicology; Environment.

B - Página de publicação do artigo 4

JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART A
<https://doi.org/10.1080/10934529.2024.2384236>



Ecotoxicological studies of direct and indirect genotoxicity with *Artemia*: a integrative review

Clessius Ribeiro de Souza^a , Gabriel Souza-Silva^a, Fernanda Viana Moreira Silva^b, Paula von Randow Cardoso^b, Walter dos Santos Lima^c, Cíntia Aparecida de Jesus Pereira^c, Marcos Paulo Gomes Mol^b, and Micheline Rosa Silveira^a

^aSocial Pharmacy Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ^bDepartment of Research and Development, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil; ^cDepartment of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ABSTRACT

Artemia is a brine shrimp genus adapted to extreme habitats like ranges salinity from 5–25 g/L and in temperatures from 9 to 35 °C. It is widely distributed and used as an environmental quality biomarker. *Artemia franciscana* and *Artemia salina* species are commonly used in ecotoxicological studies and genotoxicity assays due to their short life cycle, high fecundity rate, easy culture, and availability. Thus, considering the importance of these tests in ecotoxicological studies, the present study aimed to present *Artemia* genus as a biological model in genotoxicity research. To this end, we reviewed the literature, analyzing data published until July 2023 in the Web of Science, SCOPUS, Embase, and PubMed databases. After screening, we selected 34 studies in which the genotoxicity of *Artemia* for various substances. This review presents the variability of the experimental planning of assays and biomarkers in genotoxicity using *Artemia* genus as a biological model for ecotoxicological studies and show the possibility of monitoring biochemical alterations and genetic damage effects. Also highlight innovative technologies such as transcriptomic and metabolomic analysis, as well as studies over successive generations to identify changes in DNA and consequently in gene expression.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2024
 Accepted 20 July 2024

KEYWORDS

Brine shrimp; bioassays; enzymatic activity; gene expression; ecotoxicology

Introduction

Artemia is a genus composed of tiny brine shrimp of the Anostraca order. These organisms have small body size, and adaptability to varied nutrient resources as it is a nonselective filter.^[1] They are well adapted to extreme habitats, like ranges in salinity from 5–250 g/L and in temperatures from 6 to 35 °C, with a wide geographic distribution.^[2] *Artemia* is characterized as a primary consumer, feeding mainly on algae, acting as a trophic link between planktonic communities and the upper chains.^[3] *Artemia franciscana* and *Artemia salina* stand out among the species that make up this genus as they are commonly used in ecotoxicological and genotoxicity research.^[4] These species have a rapid life cycle, with nauplii developing into adults within two to three weeks, and a high fecundity rate, making them suitable biological models for laboratory experiments.^[1] Under adverse environmental conditions, brine shrimps produce diapausing eggs that dry out, forming resistant cysts after release.^[5]

These cysts can be easily induced to hatch under laboratory conditions. Furthermore, several other characteristics favor its use in genotoxicity studies, such as large availability and easy culture, low maintenance cost under laboratory

conditions, environmental change sensitivity, no animal test ethics committee evaluation requirements, and standardized toxicity test. However, it lacks standardization for genotoxicity assays and standard substances for biomarkers. It has many methodological variations and few gene expression studies with the *Artemia* genus.^[6,7]

Although there have been reports for over a century of the use of *Artemia* in laboratory research,^[8] *Artemia* was proposed as an organism for laboratory bioassays only in 1956.^[9] During this period, studies aimed to understand the biology and behavior of this organism, mainly on the effects of exposing cysts and nauplii of *A. salina* to salts.^[10–14]

The number of studies using *Artemia* as a biological model increased considerably after the 1950s.^[15–17] From there, outcomes such as the organism's mortality, mobility, reproduction, hatching rates, growth, and development were explored under different conditions, such as temperature, pH, salinity, photoperiod, and time of exposure to the substance under study.^[18] Numerous variations in methodological conditions were observed in the studies, and a standard method for assays using *Artemia* as a biological model was only established in 2003.^[6]

In general, ecotoxicological research using genotoxicity assays on saltwater invertebrates aims to determine the

CONTACT Clessius Ribeiro de Souza  clessiusdcq@yahoo.com.br  Social Pharmacy Department, Federal University of Minas Gerais, 6627 Antônio Carlos Avenue, UFMG Campus, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

© 2024 Taylor & Francis Group, LLC