

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA  
FARMACÊUTICA

SANDRA REGINA SILVA

**TOXICIDADE AMBIENTAL E DEGRADAÇÃO DO ANTIRRETROVIRAL  
FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA**

Belo Horizonte

2020

SANDRA REGINA SILVA

**TOXICIDADE AMBIENTAL E DEGRADAÇÃO DO ANTIRRETROVIRAL  
FUMARATO DE TENOFOVIR DESOPROXILA**

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 à obtenção do grau de Doutora em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Área de concentração: Assistência Farmacêutica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sérgia Maria Starling Magalhães - UFMG

Coorientador: Prof. Dr Marcos Paulo Gomes Mol - FUNED

Belo Horizonte

2020

Silva, Sandra Regina.

S588t Toxicidade ambiental e degradação do antirretroviral Fumarato de tenofovir desoproxila / Sandra Regina Silva. – 2020.  
106 f. : il.

Orientadora: Sérgia Maria Starling Magalhães.  
Coorientador: Marcos Paulo Gomes Mol.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Mestrado em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

1. HIV (Virus) – Teses. 2. AIDS (Doença) – Tratamento – Teses.  
3. Fumarato de tenofovir desoproxila – Teses. 4. Cianobactérias – Teses. 5. *Allium cepa* – Teses. 6. *Artemia salina* – Teses. 7. Toxicidade – Teses. 8. Biodegradação – Teses. 9. Degradação oxidativa – Teses.  
I. Magalhães, Sérgia Maria Starling. II. Mol, Marcos Paulo Gomes.  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.925

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitora**

Prof<sup>a</sup> Sandra Regina Goulart Almeida

### **Vice-reitor**

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

### **Pró-Reitor de Pós-graduação**

Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

### **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

## **FACULDADE DE FARMÁCIA**

### **Diretora**

Prof<sup>a</sup>. Leiliane Coelho André

### **Vice Diretora**

Prof<sup>a</sup>. Micheline Rosa Silveira

### **Chefe do Departamento de Farmácia Social**

Prof<sup>a</sup> Marina Lima Guimarães

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA**

### **Coordenadora**

Prof<sup>a</sup>. Maria das Graças Braga Ceccato

### **Subcoordenadora**

Prof<sup>a</sup>. Juliana Alvares Teodoro

### **Colegiado**

Prof<sup>a</sup>. Djenane Ramalho de Oliveira – Titular

Prof<sup>a</sup>. Wânia da Silva Carvalho - Suplente

Prof<sup>a</sup>. Juliana Alvares Teodoro – Titular

Prof<sup>a</sup>. Micheline Rosa Silveira - Suplente

Prof<sup>a</sup>. Cristina Mariano Ruas – Titular

Prof. Augusto Afonso G. Júnior - Suplente

Prof<sup>a</sup>. Cristiane Aparecida M. de Pádua – Titular

Prof<sup>a</sup>. Clarice Chemello – Suplente



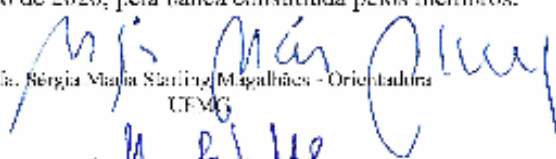
FOLHA DE APROVAÇÃO


TOXICIDADE AMBIENTAL E DEGRADAÇÃO DO ANTIRETROVIRAL FUMARATO  
DE TENOFOVIR DESOPROXILA

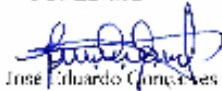
SANDRA REGINA SILVA

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


Aprovada em 05 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


  
Prof. Bêrgia Maria Santiago Magalhães - Orientadora  
UFMG

  
Dr. Marcos Paulo Gomes Mol - Coorientador  
FUNED-MG

  
Prof. José Eduardo Gonçalves  
UFMG

  
Prof. Cristiane Freitas de Azevedo Barros  
UFMG

  
Prof. M. Chelina Rosa Silveira  
UFMG

  
Prof. Raquel Sampaio Jacó  
PUCMG

Belo Horizonte, 5 de fevereiro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este trabalho, entendo que ele só foi realizado porque muitas pessoas estiveram comigo nessa caminhada; essas pessoas, cada uma à sua maneira, ajudaram-me a trilhar esse caminho que, às vezes, nos torna tão solitários. Assim, aqui chegamos; e eu não poderia de deixar de agradecer:

À Deus, por nos iluminar e estar presente nos caminhos e nas horas mais difíceis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica, por todos os conhecimentos compartilhados durante o doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Sérgia Maria Starling Magalhães, por sua orientação cuidadosa e carinhosa, por tantos ensinamentos nos momentos partilhados ao longo do meu doutoramento.

Ao Marcos Paulo Gomes Mol, pelo acolhimento carinhoso na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), por suas contribuições e sua disponibilidade para orientações durante a execução deste trabalho.

À diretoria e aos funcionários do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED, pela cooperação na execução dos ensaios de degradação oxidativa e análises de HPLC/MS, especialmente à Carolina Paula de Souza Moreira e Carolina Guerra.

Aos funcionários do Serviço de Química da Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (DIOM)/FUNED pela utilização da infra-estrutura e apoio na execução dos ensaios de Fenton.

Ao químico Rangel Caio Quinino Dutra, funcionário da FUNED, pela colaboração na realização dos ensaios de Carbono Orgânico Total.

Ao Prof. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicidade e Ecologia Aquática (LIMNEA), do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e toda sua equipe, pela parceria e fornecimento de amostras de cianobactérias para execução do trabalho.

Às professoras Liséte Celina Lange, Raquel Sampaio Jacob e Lucilaine Valéria de Souza Santos, do Departamento de Engenharia Sanitária da UFMG pelas contribuições no teste do *Aliivibrio fischeri*.

À engenheira química Olívia Maria S Ribeiro Vasconcelos, por sua generosidade, me ajudando nas análises e discussões da Reação de Fenton.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Águas da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial à Fernanda e ao Geraldo, pelo convívio e disponibilidade durante o tempo do doutorado.

À Juliana Souki, pelas discussões, execução de testes e momentos compartilhados.

Às alunas de iniciação científica Carla, Daniela, Ana, Marina, Brenda, Tais, Larissa e Natália, que contribuíram na execução dos ensaios desta pesquisa.

À Izabela, que colaborou com sua experiência nos testes de cianobactérias.

Ao Toninho, meu esposo, por todo incentivo e carinho, por estar ao meu lado incondicionalmente neste projeto, não medindo esforços para sua realização.

Aos meus filhos, Luisa e Vinícius, que souberam respeitar todas as minhas ausências; Que o conhecimento sempre os transforme em pessoas melhores.

Ao Heitor, querido neto, que chegou junto com o doutorado e trouxe luz e alegria para nossas vidas.

Aos meus irmãos Dora, Paulo e Fernando, companheiros de toda uma existência.

Aos meus sobrinhos Camila, Carolina, Rivert, Guilherme e Will, sempre me acolhendo e me ajudando a transformar as dificuldades em conhecimento.

Finalmente, especialmente à minha querida irmã Tuta, sinônimo de força e sabedoria. Seu exemplo de vida nos faz crer em nossa pequenez, além de nos atentar para o quão insignificantes são nossos problemas cotidianos.

## Planeta Água

Água que nasce na fonte serena do mundo  
E que abre um profundo grotão  
Água que faz inocente riacho  
E deságua na corrente do ribeirão

Águas escuras dos rios  
Que levam a fertilidade ao sertão  
Águas que banham aldeias  
E matam a sede da população

Águas que caem das pedras  
No véu das cascatas, ronco de trovão  
E depois dormem tranqüilas  
No leito dos lagos  
No leito dos lagos

Água dos igarapés  
Onde lara, a mãe d'água  
É misteriosa canção  
Água que o sol evapora  
Pro céu vai embora  
Virar nuvens de algodão

Gotas de água da chuva  
Alegre arco-íris sobre a plantação  
Gotas de água da chuva  
Tão tristes, são lágrimas na inundação

Águas que movem moinhos  
São as mesmas águas que encharcam o chão  
E sempre voltam humildes  
Pro fundo da terra  
Pro fundo da terra

Terra! Planeta Água  
Terra! Planeta Água

Guilherme Arantes



## RESUMO

O fumarato de tenofovir desoproxila (TDF) é um antirretroviral da classe dos análogos de nucleotídeos, um dos componentes do tratamento de primeira linha da infecção de pessoas pelo HIV/AIDS. Foram propostas neste estudo a avaliação dos potenciais efeitos citotóxicos do TDF sobre a cianobactéria *Microcystis novacekii*, o microcrustáceo *Artemia salina*, a bactéria *Allivibrio fischeri* e a avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do TDF utilizando *Allium cepa* como sistema teste. Ainda, foram comparados os processos de biodegradação usando *M. novacekii* e degradação oxidativa via reagente de Fenton para tratamento de resíduos do TDF. Os testes de toxicidade foram efetuados segundo protocolos internacionais, visando a determinação da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) do tenofovir desoproxila para as espécies envolvidas (*M. novacekii*, *A. salina* e *A. fischeri*). O potencial genotóxico e mutagênico do TDF foi estimado por exposição das sementes de *Allium cepa* ao fármaco e análise das alterações citogenotóxicas das radículas por microscopia ótica. Além disso, a biodegradação foi avaliada pela exposição da cianobactéria a concentrações não letais do TDF com o monitoramento analítico da presença do fármaco nas culturas, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas - HPLC/MS. Para a degradação oxidativa do TDF utilizou-se o reagente de Fenton e monitorou-se o processo de degradação por meio de HPLC/MS e análise do teor de carbono orgânico total (TOC). A concentração de tenofovir desoproxila que levou ao efeito inibitório de crescimento (IC<sub>50</sub>) em 96h da *M. novacekii* foi de 161.01 (156.81-165.21) mg.L<sup>-1</sup>. Para a espécie *A. salina* obteve-se a IC<sub>50</sub> após 24h de 111.82 (103.18-120.45) mg.L<sup>-1</sup>; e para *A. fischeri* a IC<sub>50</sub> em 15 min. foi de 14.83 (13.87-15.79) mg.L<sup>-1</sup>, demonstrando que o *A. fischeri*, uma bactéria decompositora, mostrou-se o organismo mais sensível ao fármaco. Os resultados do teste com *A. cepa* indicam o potencial genotóxico com a prevalência de aderências cromossômicas, brotos e micronúcleos em concentrações superiores a 26.5 mg.L<sup>-1</sup>. Os testes de biodegradação demonstraram que a cianobactéria *M. novacekii* apresentou potencial para biodegradação do TDF com remoção de aproximadamente 90% do fármaco (88.7 a 94.1)% em 16 dias. A degradação oxidativa utilizando reagente de Fenton, levou a degradação do fármaco com dois minutos de reação com taxas de remoção variando entre 58.5 e 94.1%, formando

no entanto produtos secundários, que não foram identificados. Os resultados indicam um baixo potencial citotóxico do TDF para espécies aquáticas, assim como baixa genotoxicidade, de acordo com o modelo do *A. cepa* em concentrações residuais compatíveis com sua presença no ambiente. Tanto a biodegradação pela *M. novacekii* como a degradação oxidativa mostraram-se eficientes na remoção de TDF em soluções aquosas, porém não levaram à depuração total do fármaco no meio. Ambos os processos constituem alternativas que podem ser exploradas em plantas de tratamento de efluentes e esgotos, reduzindo a difusão ambiental desses resíduos. Pode-se concluir que a baixa toxicidade observada não garante que o TDF seja um fármaco ambientalmente seguro, se considerarmos sua baixa solubilidade em meio aquoso, a possibilidade de acumulação em sedimentos e sua resistência à degradação total com os processos usuais de degradação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fumarato de tenofovir desoproxila. Cianobactérias. *Allium cepa*. *Artemia salina*. Toxicidade. Biodegradação. Degradação oxidativa. Reação de Fenton.

## ABSTRACT

Tenofovir deoproxil fumarate (TDF) is an antiretroviral in the class of nucleotide analogs, one of the components of the treatment of the first line of infection by people with HIV/AIDS. This study aimed to evaluate the potential cytotoxic effects of TDF on the cyanobacterium *Microcystis novacekii*, the *Artemia salina* microcrustacean, the bacterium *Aliivibrio fischeri* and the evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of TDF using the *Allium cepa* a test system. Still, was to compare biodegradation processes using *M. novacekii* and oxidative degradation via Fenton's reagent for treatment of TDF residues. Toxicity tests were performed according to international protocols to determine the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of tenofovir disoproxil for the species involved (*M. novacekii*, *A. salina* and *A. vibrio*). In addition, the genotoxic and mutagenic potential of TDF was estimated by exposing *Allium cepa* seeds to the drug and analysis of cytogenotoxic changes of de radicles by optical microscopy. Biodegradation was assessed by cyanobacterial exposure to non-lethal concentrations of TDF with analytical monitoring of the presence of the drug in cultures using high performance liquid chromatography coupled with HPLC/MS mass spectrometry. For oxidative degradation of TDF, Fenton's reagent was used and the degradation process was monitored by HPLC/MS and total carbon content (TOC) analysis. The concentration of tenofovir desoproxil that led to the growth inhibitory effect (IC<sub>50</sub>) at 96h of *M. novacekii* was 161.01 (156.81-165.21) mg L<sup>-1</sup>. For *A. salina* species the average inhibition after 24h was 111.82 (103.18-120.45) mg.L<sup>-1</sup> and for *A. fischeri* the IC<sub>50</sub> at 15 min was 14.83 (13.87- 15.79) mg L<sup>-1</sup>, showing that *A. fischeri*, a decomposing bacterium, was the most sensitive organism to the drug. The results of the *A. cepa* test indicate the genotoxic potential with the prevalence of chromosomal adhesions and bud and micronucleus at concentrations higher than 26.5 mg.L<sup>-1</sup>. Biodegradation tests have shown that cyanobacterium *M. novacekii* showed potential for TDF biodegradation with removal of approximately 90% of the drug (88.7 to 94.1)% in 16 days. Oxidative degradation using Fenton's reagent led to drug degradation with two minute reaction with removal rates ranging from 58.5 to 94.1% but with formation of by-products which were not identified. The results indicate a low cytotoxic potential of TDF for aquatic species as well as low genotoxicity, according to the *A. cepa* model at residual concentrations compatible with its presence in the environment. Both *M.*

*novacekii* biodegradation and oxidative degradation were efficient to remove TDF in aqueous solutions, but did not lead to total clearance of the drug in the medium. Both processes are alternatives that can be explored in effluent and sewage treatment plants, reducing the environmental diffusion of these residues. From this study it can be concluded that the low toxicity observed does not guarantee that TDF is an environmentally safe drug, considering its low solubility in aqueous medium, the possibility of sediment accumulation and its resistance to processes of degradation.

**KEYWORDS:** Tenofovir disoproxil fumarate, cyanobacteria, *Allium cepa*, *Artemia salina*, toxicity, biodegradation, oxidative degradation, Fenton reaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fórmula estrutural do fumarato de tenofovir desoproxil (TDF).....	17
Figura 1.2 - Metabolismo do tenofovir disoproxil.....	18
Figura 1.3 - Fotomicrografia de <i>Microcystis novacekii</i> em cultivo (a) e no meio ambiente (b).....	21
Figura 1.4 - Fotomicrografia de <i>Artemia salina</i> cisto (a) e larva (b).....	22
Figura 1.5 - <i>Allium cepa</i> .....	25
Figura 2.1 - Metabolism of tenofovir disoproxil.....	35
Figura 2.2 - Growth (a) inhibition (b) curves of <i>M. novacekii</i> exposed to Increasing concentrations of TDF .....	40
Figura 3.1 - Metabolism of the prodrug tenofovir disoproxil with formation of the de-esterification products: tenofovir monoester and tenofovir.....	53
Figura 3.2 - Chromatogram of TDF ASM1 medium (50 mgL <sup>-1</sup> ); ( <i>m/z</i> 404.13) monoester of tenofovir and ( <i>m/z</i> 520.18) tenofovir disoproxil .....	58
Figura 3.3 - Tenofovir disoproxil and monoester of tenofovir removal during cyanobacteria degradation process in sample of 50 mg.L <sup>-1</sup> .....	60
Figura 3.4 - Evolution of the peak areas at <i>m/z</i> 520.18 and <i>m/z</i> 404.13 obtained via HPLC/MS during TDF (at concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0 mgL <sup>-1</sup> ) biodegradation by <i>M. novacekii</i> .....	60
Figura 3.5 - Relative intensity of the peak areas at <i>m/z</i> 520.18 and <i>m/z</i> 404.13 in chromatograms of the AOP aliquots at initial concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0 mgL <sup>-1</sup> .....	63
Figura 3.6 - Removal of tenofovir disoproxil and tenofovir monoester during Fenton degradation processing sample of 50 mgL <sup>-1</sup> .....	64
Figura 4.1 - Fotomicrografias de alterações nucleares induzidas por TDF nas células meristemáticas da raiz de <i>Allium cepa</i> ; (a) broto nuclear (b) brotos nucleares e micronúcleos (c) micronúcleos.....	85
Figura 4.2 - Fotomicrografias de micronúcleos induzidos por TDF nas células região F1 de raízes de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações de TDF	87

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
Lista de figuras .....	X
CAPÍTULO 1 .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1 Fumarato de tenofovir desoproxila .....	16
2.2 Resíduos de fármacos no ambiente aquático .....	19
2.3 Teste de inibição de crescimento e determinação de IC <sub>50</sub> de substâncias exógenas para cianobactérias.....	20
2.4 Teste de inibição da mobilidade e determinação de IC <sub>50</sub> de substâncias exógenas para <i>A. salina</i> .....	22
2.5 Inibição da bioluminescência da bactéria marinha <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	23
2.6 Avaliação da genotoxicidade e o Teste de <i>Allium cepa</i> .....	24
2.7 A Degradação de poluentes .....	26
2.8 Processos oxidativos avançados – POAs .....	27
3. JUSTIFICATIVA .....	30
4. OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo geral .....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
5. ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE .....	33
CAPÍTULO 2 .....	34
CAPÍTULO 3 .....	51
CAPÍTULO 4 .....	73
CAPÍTULO 5 .....	95
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
REFERÊNCIAS .....	98

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas as questões relativas à contaminação das águas têm se tornado uma preocupação mundial. Nesse contexto, a dispersão de resíduos de produtos farmacêuticos no meio aquático tem sido alvo de inúmeros estudos, uma vez que, por serem moléculas biologicamente ativas, os efeitos ambientais são imprevisíveis, podendo pôr em risco as espécies expostas (AGUNBIADE e MOODLEY, 2016; FABBRI, 2015; FICK *et al.*, 2010; ISIDORI *et al.*, 2007; RZYMSKI *et al.*, 2017). Diversos estudos têm apontado a presença de resíduos de fármacos nas águas superficiais e tratadas (GONZÁLEZ *et al.*, 2012; HANNA *et al.*, 2018; MAHMOOD *et al.*, 2019; WOOD *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Os medicamentos constituem uma classe emergente de contaminantes que passaram a ter importância como poluentes ambientais devido à ampliação das opções terapêuticas e a facilidade de acesso a tratamentos nas últimas décadas. Entre os principais problemas relacionados aos resíduos ambientais de produtos farmacêuticos destacam-se o risco iminente à biota aquática e a bioacumulação na cadeia alimentar (FENT e CAMINADA, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2012; KUSTER e ADLER, 2014).

Mesmo em concentrações muito baixas no ambiente aquático, os riscos inerentes à contaminação por poluentes diversos são preocupantes pela exposição crônica dos organismos aquáticos e precisam, assim, ser elucidados. Dentre os xenobióticos, os agentes citotóxicos, fitotóxicos e mutagênicos constituem uma preocupação particular, pois podem desencadear efeitos deletérios sobre as comunidades aquáticas, comprometer a viabilidade do patrimônio genético e a reprodução desses organismos, levando a desequilíbrios na comunidade aquática. Os danos são ainda mais graves se atingirem a população humana de forma direta ou indireta (AGUNBIADE e MOODLEY, 2016; FABBRI, 2015; FICK *et al.*, 2010; HARTMANN *et al.*, 1999; ISIDORI *et al.*, 2007; KÜMMERER e AL-AHMAD, 2010; OHE *et al.*, 2004; RZYMSKI *et al.*, 2017; ZEGURA *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos medicamentos, evitar que seus resíduos cheguem ao ambiente aquático é uma tarefa árdua. Além dos resíduos de produção industrial, o extenso uso de medicamentos para tratamento de doenças humanas e

animais causa a contaminação de esgotos por fármacos. Mesmo quando os efluentes domésticos e industriais recebem o tratamento em estações de tratamento convencionais, não há a total remoção de micropoluentes, promovendo sua dispersão no ambiente aquático. Desse modo, para prevenir danos ao ecossistema aquático e, por conseguinte, à população humana, é imprescindível conhecer o potencial tóxico dos fármacos no ambiente e desenvolver métodos simples, de baixo custo e operacionalmente viáveis para o tratamento desse tipo de resíduo.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fumarato de tenofovir desoproxil

De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), em 2019, aproximadamente 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo estão vivendo com HIV, mas apenas cerca de 23,3 milhões têm acesso à terapia antirretroviral. No Brasil, em 2016, estimava-se que aproximadamente 830 mil pessoas viviam com HIV/AIDS, enquanto cerca de 490 mil faziam uso de medicamentos para tratar a doença. A prevalência de HIV estimada para o Brasil ficou entre 0,4 e 0,7% da população e estima-se que, naquele ano, ocorreram 44.000 novas infecções pelo HIV.

O Brasil adota como estratégias para frear a epidemia de AIDS o acesso ao tratamento a todas as pessoas vivendo com HIV, simplificando e descentralizando o tratamento antirretroviral. A sobrevivência das pessoas vivendo com HIV aumentou muito a partir dos anos 2000, em função de novas medicações introduzidas na terapêutica e no entendimento e manejo da doença (BRODER, 2010; TEERAANANCHAI *et al.*, 2016).

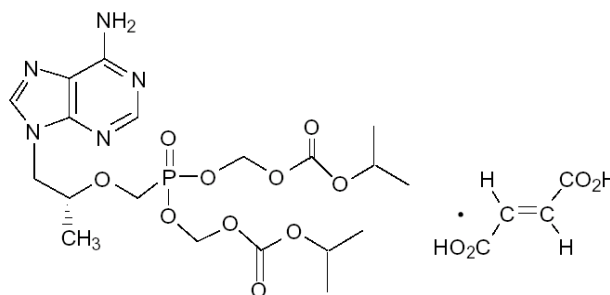
Em 1993, o tenofovir (TFV) teve sua atividade antirretroviral descrita por Balzarini e colaboradores. Contudo, somente em 2001, o fármaco foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) na forma de fumarato de tenofovir desoproxil (TDF) para o tratamento de HIV/AIDS (MASHO *et al.*, 2007).

Assim, o TDF foi o primeiro fármaco liberado para uso como um análogo de nucleotídeo inibidor da transcriptase reversa (ITRNt) do HIV. Trata-se de um fármaco com elevada eficácia na redução da carga viral quando comparado a outros fármacos da mesma classe (MURPHY *et al.*, 2017; MEINTJES *et al.*, 2017; BALZARINI *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2005) sendo, ainda, um dos poucos fármacos que apresentam atividade contra o HIV-1 e o HIV-2 (ANDREATA *et al.*, 2013). O TDF também é empregado para o tratamento da hepatite B, sendo mais recomendado em casos de resistência à lamivudina e coinfeções HIV-HBV. É um dos componentes do tratamento de primeira linha para a infecção pelo HIV, sendo utilizado em formulação em dose fixa composta por Tenofovir (300 mg), Lamivudina

(300 mg) e Dolutegravir (50 mg), o que permite melhor adesão ao tratamento de pessoas que vivem com HIV/AIDS (BRASIL, 2018).

A nomenclatura oficial do TDF é fumarato de 9-[(R)-2-[[bis[[[(isopropoxycarbonil)oxi]metoxi]fosfonil] metoxi] propil] adenina. Sua fórmula molecular é  $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P$ .  $C_4H_4O_4$  e apresenta massa molar de 635,52 (KEARNEY *et al.*, 2004). A sua fórmula estrutural está representada na Figura 1.1 (LEITE *et al.*, 2015). O TDF possui solubilidade de  $13,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em água destilada a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (DE CHRISTOFORO e PENZAK, 2004), é solúvel em metanol e muito pouco solúvel em diclorometano (THE INTERNATIONAL, 2016). Constitui-se de um pó cristalino branco ou quase branco, com coeficiente de partição igual a 1,25 em tampão fosfato pH 6,5 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e pka igual a 3,75 (REMINGTON e BERINGER, 2006).

**Figura 1.1 - Fórmula estrutural do fumarato de tenofovir desoproxil (TDF)**



Fonte: Leite *et al.*, 2015

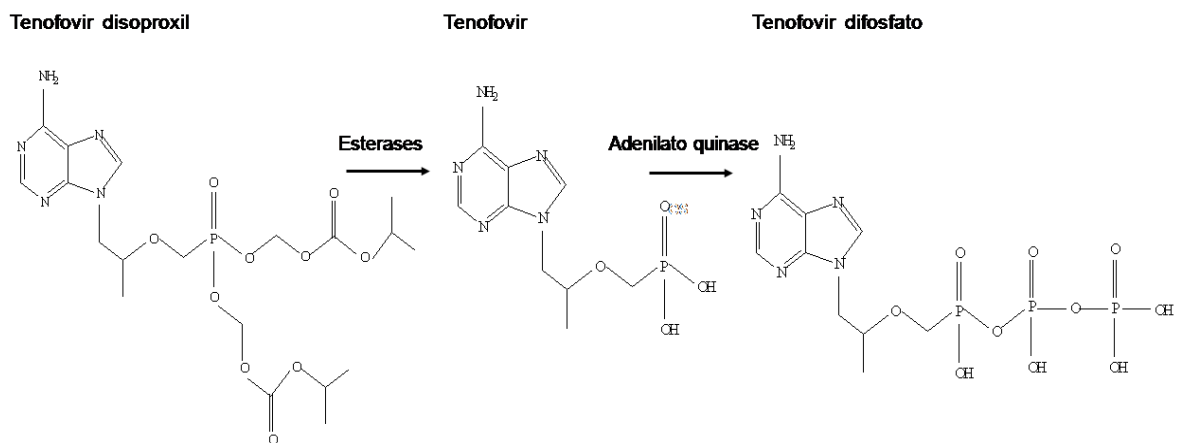
Ressalta se que o tenofovir (TFV) constitui a porção ativa da molécula, sendo administrado na forma de pró-fármaco, ou seja, da molécula modificada pela introdução do grupamento desoproxil, a qual libera o fármaco ativo após absorção. O TDF apresenta maior estabilidade, absorção intestinal e disponibilidade oral do que o TFV, permitindo a sua formulação em comprimidos (BROOKS *et al.*, 2019; DE CLERQ, 2007), sendo normalmente disponibilizado na forma de comprimidos revestidos de 300 mg.

O TFV é uma molécula muito polar o que limita sua absorção oral e justifica sua preparação como um pro-fármaco, de maior lipossolubilidade. Após administração oral, o TDF é absorvido e sofre hidrólise por enzimas plasmáticas, dando origem ao TFV (Figura 1.2) que penetra nas células onde é fosforilado por

quinases celulares. A desesterificação pode ocorrer ainda no trato gastrointestinal por via química ou enzimática, fazendo com que o fármaco apresente baixa biodisponibilidade por via oral, aproximadamente 25% em jejum (GEBOERS *et al.*, 2015; MOSS *et al.*, 2017; MURPHY *et al.*, 2017).

Essa molécula, após a fosforilação torna-se um análogo estrutural da adenosina 5' monofosfato e, por competição, liga-se irreversivelmente à transcriptase reversa, levando à inativação da enzima e encerrando precocemente a replicação do DNA. Até 80% da dose absorvida pode ser eliminada pela urina na forma inalterada (KEARNEY *et al.*, 2004), o que indica a grande resistência do fármaco TFV à metabolização por sistemas biológicos.

**Figura 1. 2 - Metabolismo do tenofovir disoproxil**



No Brasil, a Fundação Ezequiel Dias (FUNED) foi o primeiro laboratório oficial autorizado a produzir medicamentos que apresentam TDF em sua forma farmacêutica, a associação TDF à lamivudina e efavirenz.

A FUNED situa-se em área urbana, na região metropolitana de Belo Horizonte. Embora todo o processo de implantação da produção seja cuidadosamente planejado, há limitações no conhecimento da estabilidade ambiental dos resíduos que podem se originar da produção, assim como das formas mais eficientes de tratamento para degradação desses resíduos.

## 2.2 Resíduos de fármacos no ambiente aquático

De um modo geral, no que se refere aos medicamentos, existem quatro fontes principais de contaminação do ambiente aquático: o esgoto urbano, no qual se encontram resíduos de uma infinidade de fármacos consumidos pela população; o descarte indevido de medicamentos no esgoto; o esgoto hospitalar e os resíduos de indústrias de produção de medicamentos. Todas essas fontes geram resíduos que tendem a se dispersar pelo ambiente e, por estarem em concentrações residuais, são de difícil detecção e tratamento (FENT e CAMINADA, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2012; HANNA *et al.*, 2018; HERNANDO *et al.*, 2006; KÜMMERER, 2001; MAHMOOD *et al.*, 2019; WOOD *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2007).

O monitoramento dos resíduos de fármacos nos efluentes gerados na produção de medicamentos, entre eles o TDF, e seus efeitos sobre organismos de diferentes níveis tróficos, pode apontar a necessidade de tratamentos complementares desse efluente, reduzindo a entrada do fármaco e de seus metabólitos nos corpos d'água receptores. Diversos estudos demonstraram que as estações de tratamento de esgotos convencionais não se mostram eficientes para a eliminação total dos produtos orgânicos bioativos (BADAWY *et al.*, 2009; GODOY *et al.*, 2015; SUAREZ *et al.*, 2009; ZHANG e GAL, 2008). Concentrações de 145–243 ngL<sup>-1</sup> de tenofovir foram relatadas por Wood *et al.*, (2015) em rios da África do Sul.

Assim, fica evidenciada a necessidade de aprimorar os métodos de detecção dos resíduos de fármacos no ambiente e de avaliação de sua toxicidade e bioacumulação, inclusive no organismo humano, em função da exposição crônica aos resíduos de fármacos.

Do ponto de vista ecológico, as comunidades aquáticas são complexas, e as múltiplas espécies apresentam sensibilidade diferenciada aos xenobióticos. O desequilíbrio nessas comunidades, geralmente, se reflete em problemas ambientais que vão desde as florações de algas e cianobactérias até a mortandade de peixes e outros animais aquáticos. Nesse contexto, busca-se conhecer os efeitos tóxicos de xenobióticos sobre alguns representantes dessa comunidade como forma de estimar o impacto da presença de agentes exógenos (GHOSH, 2017; TAYLOR e SENAC, 2014).

O monitoramento da toxicidade por meio de ensaios simples utilizando organismos teste padronizados permite monitorar a presença de substâncias exógenas residuais no meio aquático. Para esse monitoramento, em geral, são usados indicadores, ou seja, espécies ou grupos de espécies cuja presença, abundância e integridade são indicativos biológicos da situação ambiental. Diversos organismos aquáticos podem ser utilizados como indicadores de toxicidade; não há, portanto, um único organismo padrão para avaliação ambiental, uma vez que é variável a resposta metabólica dos diferentes organismos vivos às substâncias químicas. Espécies muito sensíveis podem ser bons indicadores de toxicidade (GONZÁLEZ-PLEITER *et al.*, 2013).

### **2.3 Teste de inibição de crescimento e determinação de IC<sub>50</sub> de substâncias exógenas para cianobactérias**

A segurança em relação aos efeitos ambientais danosos de poluentes é estabelecida a partir de baterias de testes com organismos de diferentes níveis tróficos. A avaliação de efeitos sobre a comunidade fitoplanctônica é um dos testes sugeridos pela Resolução CONAMA N° 430 (BRASIL, 2011). Usualmente, esses testes são expressos pela concentração inibitória de crescimento de 50% (IC<sub>50</sub>) da espécie ou pela dose letal para 50% dos organismos (DL<sub>50</sub>). Esses índices são ferramentas importantes para monitorar o ambiente e prevenir o desequilíbrio da comunidade aquática e a dominância das espécies mais resistentes aos poluentes e a implicações ambientais diretas.

A determinação da toxicidade de xenobióticos para espécies fitoplanctônicas é padronizada por entidades internacionais de proteção ambiental, como Environmental Protection Agency dos Estados Unidos (US EPA), e de padronização, como American Society for Testing and Materials (ASTM), Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), Association of Analytical Communities (AOAC) e International Organization for Standardization (ISO) por meio de protocolos para avaliação da toxicidade (RONCO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008).

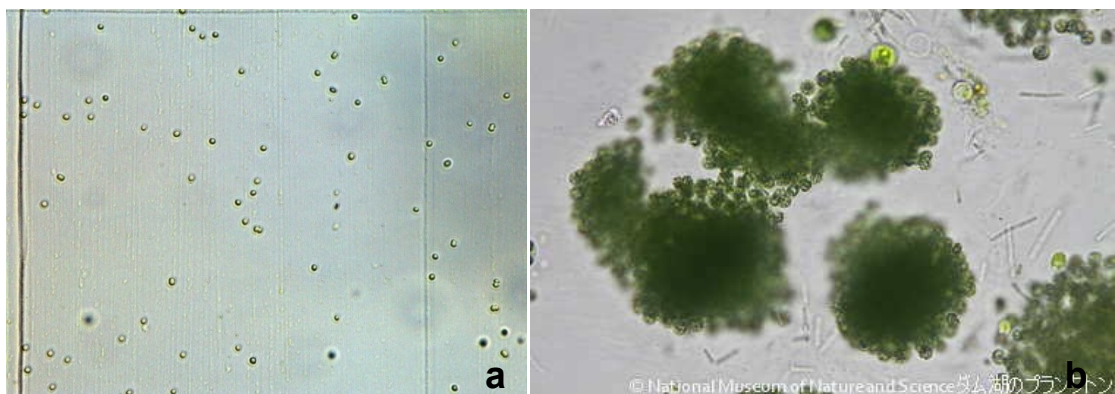
As espécies fitoplanctônicas são produtoras primárias, constituindo a base da cadeia trófica nos ambientes aquáticos, sendo consideradas importantes organismos teste para avaliação da toxicidade ambiental (BRIERLEY, 2017). As

técnicas para avaliação do crescimento fitoplanctônico são simples, o que facilita o monitoramento das espécies. Assim, podem ser utilizados métodos como a espectrofotometria, a contagem celular ao microscópio ótico ou o doseamento da clorofila. Esses testes, amplamente utilizados, estimam a sensibilidade do organismo fitoplanctônico a um agente tóxico, por meio de uma curva dose resposta. A determinação da  $IC_{50}$  para organismos fitoplanctônicos é uma ferramenta muito útil, pois como esses organismos são produtores primários, podem indicar rapidamente a presença de agentes tóxicos, antes que os organismos consumidores sejam atingidos (CETESB, 2013, OECD, 2006).

A cianobactéria *Microcystis novacekii* (Figura 1.3) apresenta-se na forma colonial no meio ambiente e como organismo unicelular em cultivo, é procarionte e fotossintetizante. Sobrevive em ambientes aquáticos poluídos, atuando de forma dominante em relação a outras espécies. Apresentam, ainda, a capacidade de acúmulo e biodegradação de diferentes tipos de poluentes, além de serem eficientes na assimilação de compostos orgânicos (EL-BESTAWY *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2018).

Baselga-Cervera *et al.* 2019, avaliaram as respostas da exposição de microalgas e cianobactérias, a ampicilina ( $6-14 \text{ mg L}^{-1}$ ), ao longo de um mês e concluíram que as espécies pesquisadas apresentaram altas taxas de degradação da ampicilina, destacando o potencial de microalgas para mitigar os impactos ambientais causados pelos antibióticos.

**Figura 1.3 - Fotomicrografia de *Microcystis novacekii* em cultivo (a) e no meio ambiente (b)**

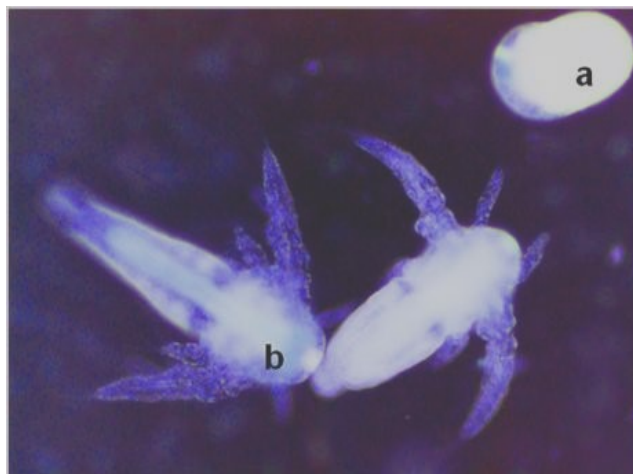


Fonte: b-<https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/dam/103-4-0.html> acesso 22.02.20

## 2.4 Teste de inibição da mobilidade e determinação de IC<sub>50</sub> de substâncias exógenas para *A. salina*

A *Artemia salina* (Figura 1.4) é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça), possui distribuição cosmopolita e pode sobreviver em ambientes aquáticos em que ocorrem grandes variações de salinidade (MAROUANE, 2017). Além disso, os organismos desse gênero atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores. Essa espécie tem sido grandemente empregada em testes de toxicidade aguda, devido a sua simplicidade e praticidade de manuseio e cultivo (ATES *et al.*, 2012; ARULVASU *et al.*, 2014).

Figura 1.4 - Fotomicrografia de *Artemia salina* cisto (a) e larva (b) (aumento 100 x)



A *A. salina* forma cistos dormentes que, nas condições adequadas, eclodem liberando as larvas. Esse organismo apresenta um complexo mecanismo enzimático para permitir sua locomoção, o qual é muito sensível à presença de substâncias exógenas. A *A. salina* se alimenta primordialmente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio, o que pode também dar informações sobre possível bioacumulação na cadeia trófica (BROWNE, 2018; WEBER *et al.*, 1991). Por suas características, a *A salina* é um bom sistema teste para avaliação da toxicidade de substâncias exógenas. O teste de toxicidade usando *A. salina* permite a observação visual da imobilização das larvas quando expostas a níveis iguais ou superiores à dose de efeito do xenobiótico (COSTA *et al.*, 2008).

Nesse sentido, a utilização da artemia como organismo teste justifica-se por ser um modelo de execução rápida e de baixo custo (RAJABI *et al.*, 2015). Apesar de os testes de toxicidade serem em sua maioria, frequentemente realizados com organismos testes de água doce, o uso de *A. salina* é recomendado, pois os ambientes salinos são normalmente o destino final de despejo de efluentes (COSTA *et al.*, 2008).

Os testes com *A. salina* tem sido utilizados para a avaliação da toxicidade de fármacos como géis com 1% de testosterona e 0,1% de estradiol (VIEGA *et al.*, 2019) e de formulações antifúngicas (CARTAGENA *et al.*, 2017).

## **2.5 Inibição da bioluminescência da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri***

A bactéria bioluminescente *A. fischeri*, é um organismo gram-negativo, heterotrófico, com distribuição cosmopolita. É uma bactéria, de vida livre, que utiliza como fonte de carbono a matéria orgânica dissolvida ou particulada de ambientes marinhos (ABBAS *et al.*, 2018; ROIG *et al.*, 2013). Apresenta como característica a emissão de luz em condições ambientais favoráveis.

A bioluminescência é um processo enzimático complexo e a inibição de qualquer das enzimas envolvidas na cadeia de reações resulta na diminuição da produção da luz emitida pelas bactérias (GREGOR *et al.*, 2018). Assim, esse é um modelo muito sensível para a avaliação da toxicidade de substâncias químicas pela rápida resposta às variações ambientais (GHOSH *et al.*, 2017; WELTENS *et al.*, 2014).

O teste de *A. fischeri* tem como características a facilidade de aplicação, reprodutibilidade, sensibilidade e baixo custo. Vários estudos mostraram correlações significativas entre os dados de toxicidade dos testes de *A. fischeri* e os obtidos para outras espécies, incluindo peixes, crustáceos e algas (JACOB *et al.*, 2016; KAISER, 1998; PARVEZ *et al.*, 2006).

O modelo *A. fischeri* tem sido empregado para investigar as propriedades ecotoxicológicas de fármacos como o cetoprofeno (MENNILLO *et al.*, 2018), a sertralina (MINAGH *et al.*, 2009) assim como para efluentes brutos de indústria farmacêutica (MASELLI *et al.*, 2015) mostrando-se útil como indicador de toxicidade.



## 2.6 Avaliação da genotoxicidade e o teste de *Allium cepa*

Segundo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD, (2015), existem dois tipos de ensaios em genética toxicológica. O primeiro tipo é composto por testes que avaliam danos diretos e irreversíveis ao DNA, capazes de serem transmitidos para gerações celulares subsequentes, se não forem letais, sendo denominados testes de mutagenicidade. Outro tipo são os testes que medem, efeitos potencialmente reversíveis sobre o DNA, ou seja sobre mecanismos envolvidos na preservação da integridade do genoma, sendo denominados testes de genotoxicidade.

Na atualidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos causados por produtos químicos tornaram-se um problema ambiental importante devido ao comprometimento da viabilidade das espécies expostas e especialmente pela correlação entre tais efeitos e a carcinogênese (BIANCHI *et al.*, 2011). Diversos ensaios foram desenvolvidos nas últimas décadas utilizando microrganismos, insetos, plantas e animais para identificar agentes que promovem danos genéticos (HOUK, 1992). Esses ensaios utilizam sistemas constituídos por organismos íntegros, órgãos, tecidos ou células, os quais apresentam respostas biológicas como alterações bioquímicas, fisiológicas e/ou comportamentais quando expostos a substâncias químicas que afetam sua integridade gênica (CAPELA, 2001).

A utilização de bioensaios com procariotos mostra bons resultados na detecção de agentes que induzem mutações gênicas e danos primários ao DNA. O ensaio mais conhecido é o teste de mutagenicidade usando *Salmonella*, conhecido também como teste de Ames, amplamente empregado para aquele fim. Porém, os testes com organismos eucariotos permitem detectar uma amplitude maior de danos, incluindo mutações gênicas, danos e reparo do DNA, danos cromossômicos e aneuploidias (HOUK, 1992; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Entre os eucariotos, vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliar poluentes ambientais, sendo frequentemente utilizados em estudos de monitoramento (FISKESJO, 1985; GRANT, 1994). Várias espécies como *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia spp*, *Nicotiana tabacum*, *Capillaris crepis* e *Hordeum vulgare* são empregadas na avaliação de contaminação ambiental (GRANT, 1994).

Entre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* (Figura 1.5) é uma das mais utilizadas nos estudos de fitotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade por suas características, como a cinética de proliferação com crescimento rápido de raízes, o grande número de células em divisão, a tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante todo o ano, o fácil manuseio, e, ainda, por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n=16$ ) e de grande tamanho, o que facilita a avaliação da integridade do processo proliferativo (FISKEJO, 1985; HERRERO *et al.* 2012). Esse teste consiste na exposição de sementes da espécie *A. cepa* às condições de germinação, frente à concentrações conhecidas da substância-teste (FISKEJO, 1985).

Além da resposta sobre a germinação e o crescimento celular, esse ensaio permite a avaliação de aberrações cromossômicas e alterações nucleares que podem ser observadas por meio de cortes histológicos das radículas (HARA e MARIN-MORALES, 2017; HERRERO *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Esse ensaio mostra alta sensibilidade e boa correlação com outros tipos de testes de genotoxicidade e tem sido utilizado com sucesso para avaliação do potencial mutagênico de amostras ambientais (CUCHIARA *et al.*, 2012).

**Figura 1.5 - *Allium cepa***



Fonte: <https://www.britannica.com/topic/plant>

Vários pesquisadores utilizando o teste do *A. cepa* têm avaliado o potencial citogenotóxico de fármacos como glicocorticóides (OLIVEIRA *et al.*, 2017) antineoplásicos (MEINTJES e STEPHEN, 1980; MIŠÍK *et al.*, 2014), do ansiolítico alprazolam (NEFIC *et al.*, 2013), do anti-hipertensivo metildopa (GRISOLIA e

TAKAHASHI, 1991), de antimicrobianos derivados da sulfadiazina (ABDEL-AZEEM *et al.*, 2014) e dos ARVs zidovudina e nevirapina (ONWUAMAH *et al.*, 2014).

## 2.7 A Degradação de poluentes

A inevitável dispersão de resíduos de medicamentos no ambiente tornou estratégico o desenvolvimento de métodos eficientes e baratos de tratamento de efluentes industriais e urbanos e da água na perspectiva do reuso (DAOUK *et al.*, 2015; KUMMERER, 2009; LUO *et al.*, 2014; NCUBE *et al.*, 2018).

O próprio ecossistema é capaz de mitigar os efeitos danosos de xenobióticos ao ambiente aquático por meio da biodegradação e autodepuração. Esse processo é fundamental para a depuração ambiental em condições naturais, levando à decomposição dos xenobióticos. Salienta-se que o emprego de microrganismos que utilizam a matéria orgânica presente na água como fonte nutricional constitui a principal ferramenta explorada sistematicamente no tratamento de águas poluídas (ABINANDAN e SHANTHAKUMAR, 2015; CHEKROUN *et al.*, 2014; TOLBOOM *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2012).

Dessa forma, a biorremediação se refere ao uso planejado do potencial metabólico dos microrganismos com objetivo de recuperação ambiental. Apesar de sua grande eficiência, o processo possui limitações. Eventualmente, a biorremediação pode apresentar riscos em razão da formação de metabólitos tóxicos, produtos secundários do metabolismo com toxicidade maior que o composto original, transformando-se em um segundo problema ambiental de igual magnitude. Além disso, espécies muito sensíveis não sobrevivem à exposição ao fármaco original ou aos seus metabólitos (HE *et al.*, 2016; RANA *et al.*, 2017).

O emprego de tecnologias de tratamento de efluentes utilizando espécies fitoplanctônicas tem despertado interesse crescente nos últimos anos, por se tratar de processos mais sustentáveis quando comparados a tecnologias convencionais. Sendo organismos fotossintetizantes, essas espécies fixam carbono e geram biomassa que pode ser utilizada para a geração de energia. Assim esses organismos podem representar uma potencial solução para a degradação de resíduos de diversos poluentes em águas residuais (TOLBOOM *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016). Espécies fitoplanctônicas, especialmente quando associadas, possuem

habilidades para degradar diferentes tipos de substâncias químicas (ABINANDAN e SHANTHAKUMAR, 2015; WU *et al.*, 2012).

Nesse contexto, cianobactérias formam um grupo particular de organismos fitoplanctônicos relacionados com a biorremediação. São abundantes em ecossistemas eutróficos apresentando grande resistência e adaptabilidade a vários poluentes orgânicos. Esses organismos ancestrais são considerados os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (CARMICHAEL, 1994; LACEN - PE, 2008). As cianobactérias são aeróbicas e realizam fotossíntese como a principal via de obtenção de energia. Algumas espécies apresentam também a habilidade de nutrição heterotrófica (CETESB, 2004). Esses microrganismos são cosmopolitas e podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, embora estejam predominantemente em água doce (CETESB, 2004; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As características das cianobactérias sugerem que, em processos de biorremediação, elas possam constituir ferramentas tecnológicas com grandes perspectivas. Nas estações de tratamento de efluentes, as cianobactérias como agentes de biodegradação quase não geram subproduto residual, sendo o seu uso um método potencialmente mais barato e, em combinação com os diferentes processos físico-químicos e de oxidação avançada, oferece um melhor tratamento das águas residuais industriais farmacêuticas e, assim, ajuda a utilizar os recursos hídricos disponíveis de maneira sustentável. É provável que, com um manejo adequado, as cianobactérias venham a se tornar uma das melhores tecnologias usadas para limpar e proteger o meio ambiente (RANA *et al.*, 2017).

## **2.8 Processos oxidativos avançados – POAs**

O tratamento de águas superficiais contendo concentrações residuais de fármacos, especialmente aqueles muito estáveis e resistentes ao tratamento biológico, tem sido um grande desafio, pois as técnicas convencionais de tratamento de esgotos não são, em geral, eficientes para eliminação desses poluentes (BADAWY *et al.*, 2009; GODOY *et al.*, 2015). Nesses casos a utilização de Processos Oxidativos Avançados (POAs) tem se destacado como forma inovadora e eficiente no tratamento de resíduos de fármacos e medicamentos e apresenta-se

como uma alternativa para redução da carga orgânica e consequente diminuição do impacto ambiental.

Os POAs englobam diferentes processos que ocorrem através da produção de radicais extremamente reativos e pouco seletivos. Esses processos são descritos para redução da carga orgânica e são aplicáveis principalmente a efluentes da indústria farmacêutica (AZBAR *et al.*, 2004; MIRZAEI *et al.*, 2017; OLLER, 2011). O reagente de Fenton tem sido um dos POAs mais utilizados devido à fácil operacionalidade, além da utilização de insumos de fácil acesso e na forma convencional, não sendo necessário aporte de energia (MATAVOS-ARAMYAN e MOUSSAVI, 2017). O método foi proposto por Fenton em 1894 e consiste na geração de radicais hidroxila, com elevado potencial de ionização, a partir do peróxido de hidrogênio e de catalisador, em geral, íons ferro divalentes. Os radicais interagem com substâncias presentes no meio, promovendo quebras e adições às moléculas orgânicas, em uma reação em cadeia que visa à degradação total do composto orgânico (BOKARE e CHOI, 2014; MIRZAEI *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019).

Um esquema simplificado da reação de Fenton é apresentado pelas reações 1,2 e 3.



A reação de Fenton tem sido utilizada com sucesso na degradação de diversos tipos de efluentes, tais como aqueles contendo clorofenóis, surfactantes, corantes e também na oxidação de lixiviados de resíduos de aterros. Esse processo pode ser usado também para a redução da carga orgânica, como forma de aumentar a biodegradabilidade de compostos para um posterior tratamento biológico (AY e KARGI, 2010; BABUPONNUSAMI e MUTHUKUMAR, 2014; GAUR *et al.*, 2018).

Apesar disso, o processo oxidativo usando o reagente de Fenton tem como limitação a geração de subprodutos que demandam tratamento e destinação final, além do seu maior custo se comparado à biodegradação, em função dos reagentes usados. No entanto, as condições podem ser otimizadas para que

alcance a mineralização dos resíduos. Apesar das limitações, a rapidez e eficiência do processo oxidativo com reagente de Fenton é, em termos de rotina industrial, de extrema importância (BABUPONNUSAMI e MUTHUKUMAR, 2014).

### 3. JUSTIFICATIVA

Os grandes avanços na terapia obtidos a partir do século XX promoveram uma revolução na saúde humana, com melhoria da qualidade e expectativa de vida; Contudo, surgiram novos problemas decorrentes da introdução e do extenso uso de medicamentos. Os resíduos de fármacos lançados no ambiente diariamente, tanto oriundos do uso como das atividades produtivas, tornaram-se potenciais poluentes, em geral do meio aquático, sendo incluídos no grupo dos contaminantes emergentes.

No Brasil, segundo Moraes Reis e Nascimento Pontes,(2019), apenas 38% do esgoto doméstico passa por tratamento, estimativa que não considera a parcela que possui sistema de coleta, no entanto ainda não foi efetivado o tratamento do esgoto antes do seu lançamento nas águas superficiais. Em relação aos efluentes hospitalares, a situação ainda é mais grave, devido ao fato de muitas unidades não apresentarem segregação adequada, em função de infraestrutura antiga, e também de o lançamento ocorrer sem tratamento direto nos corpos d'água. As indústrias farmacêuticas também são outra fonte de resíduos de fármacos e estão sujeitas a legislações específicas, porém, nem sempre o impacto ambiental dos efluentes é monitorado, especialmente devido à um déficit legal sobre o tema. É importante destacar que mesmo em regiões onde o esgoto é tratado, os fármacos, como contaminantes emergentes residuais, não são totalmente removidos e nem monitorados rotineiramente.

A grande demanda pela água e sua potencial escassez indica a necessidade futura do reuso, o que já é realidade em alguns países. Isso aumenta a responsabilidade dos produtores de medicamentos de contribuírem tanto no estudo dos efeitos ambientais diretos quanto no desenvolvimento de técnicas de degradação de fármacos, a fim de minimizar o potencial risco de efeitos sobre o ecossistema.

Não há, tradicionalmente, uma preocupação da área farmacêutica no que diz respeito ao estudo do impacto de medicamentos sobre o ambiente. Contudo, o farmacêutico, valendo-se do seu conhecimento sobre a ação dos fármacos, pode contribuir significativamente nesse processo, uma vez que esse profissional pode orientar as pesquisas e estudos a fim de que se evidenciem os fármacos de maior risco ambiental. Esse projeto foi motivado pela preocupação com potenciais efeitos

do tenofovir desoproxil no ambiente, em função dessa classe de medicamentos interferir diretamente na biossíntese do DNA viral. Como muitas espécies apresentam enzimas homólogas pertencentes à mesma via metabólica, potenciais efeitos ambientais desse fármaco precisam ser elucidados.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do fumarato de tenofovir desoproxila, para quatro organismos teste de diferentes níveis tróficos e comparar o potencial de degradação desse fármaco por cianobactéria e processo oxidativo avançado.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração de TDF que leva a 50% de inibição do crescimento ( $IC_{50}$ ) da linhagem da cianobactéria *Microcystis novacekii*;
- Determinar a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do TDF para o microcrustáceo *Artemia salina*;
- Estabelecer a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do TDF para a bactéria *Aliivibrio fischeri*;
- Investigar o potencial do TDF para gerar danos germinativos à espécie vegetal *Allium cepa*;
- Avaliar a ocorrência de efeitos genotóxicos após a exposição de sementes de *A. cepa* ao TDF por meio da determinação do índice mitótico, das alterações cromossômicas, das alterações nucleares e da formação de micronúcleos nas células da região meristemática e região F1 das sementes de *A. cepa*;
- Avaliar o potencial de biodegradação do TDF pela cianobactéria *M. novacekii*;
- Avaliar a aplicabilidade do reagente de Fenton para a degradação do TDF;

## 5. ORGANIZAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

Esta tese foi desenvolvida no formato de artigos, de acordo com as etapas metodológicas propostas no projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

O capítulo 1 foi elaborado para apresentar introdução, revisão bibliográfica e os objetivos geral e específicos do trabalho.

No capítulo 2, é apresentado o artigo 1, publicado no Journal Environment Protection (Silva, S. R., Barbosa, F. A. R., Mol, M. P. G. & Magalhães, S. M. S., 2019). Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. *Journal of Environmental Protection*, 10 (12), 1565), no qual aborda-se a toxicidade do fumarato tenofovir desoproxil (TDF) para três organismos teste.

No capítulo 3 é apresentado o estudo de biodegradação dos resíduos do antirretroviral fumarato de tenofovir desoproxil pela cianobactéria *Microcystis novacekii* e a degradação química utilizando o processo oxidativo avançado com reagente de Fenton. O artigo referente a essa etapa, intitulado **Removal of antiviral Tenofovir disoproxil in water using biodegradation by cyanobacteria and treatment via an advanced oxidation process.**

No capítulo 4 descreve-se a aplicação do teste do *Allium cepa* para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do fumarato de tenofovir desoproxil. O artigo elaborado a partir dos resultados desse ensaio intitulado **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do antirretroviral fumarato de tenofovir desoproxil usando o modelo *Allium cepa***, após incorporação das sugestões da banca, será traduzido para o inglês e submetido ao periódico Environmental Toxicology.

Finalmente, no capítulo 5, são apresentadas as considerações finais e as conclusões do trabalho.

## CAPÍTULO 2

### Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil

Silva S R<sup>1</sup>, Barbosa F A R<sup>3</sup>, Mol M P G<sup>2</sup>, Magalhães S M S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Social Pharmacy, Pharmacy School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Research and Development Board. Ezequiel Dias Foundation. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

#### **Abstract**

Tenofovir disoproxil fumarate is a prodrug, i.e. inactive substance converted in vivo, after absorption to the active form de-esterified tenofovir, which acts as an inhibitor of viral reverse transcriptase. To better understand the toxic effects of these drugs in the environment, three organisms were tested, and the effective concentration (IC<sub>50</sub>) of tenofovir disoproxil that resulted in 50% growth inhibition of *Microcystis novacekii*, 50% immobilization of *Artemia salina*, and 50% loss of bioluminescence of *Aliivibrio fischeri* were evaluated. The IC<sub>50</sub> value after 96 h of treatment for the cyanobacterium was 161.01(156.81-165.21) mg.L<sup>-1</sup>; the IC<sub>50</sub> value for *A. salina* after 24 h of treatment was 111.82 (103.18-120.45) mg.L<sup>-1</sup>; and the IC<sub>50</sub> at 15 min for *A. fischeri* was 14.83 (13.87-15.79) mg.L<sup>-1</sup>. The test organism most sensitive to the drug was *A. fischeri*, indicating the importance of using representative models at different trophic levels to assess the potential risk of drugs for environmental toxicity. These results highlight the possible effect of tenofovir disoproxil on decomposer organisms, which may contribute to the environmental persistence of this drug.

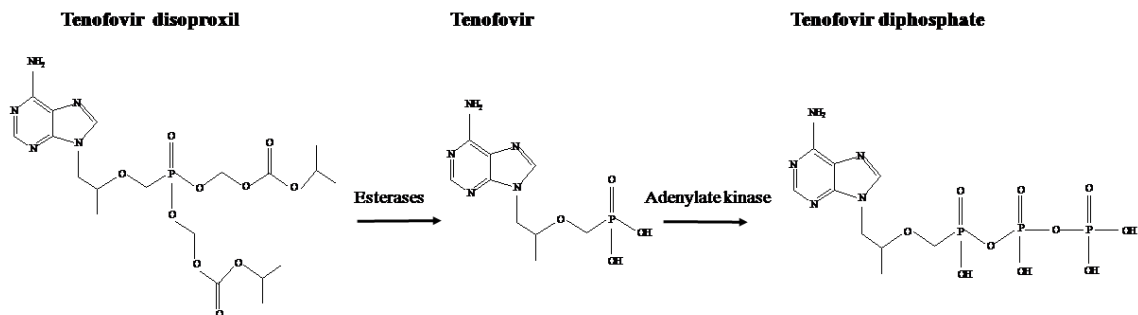
**Keywords:** Emerging contaminant, *Aliivibrio fischeri*, *Artemia salina*, *Microcystis novacekii*.

## 1.Introduction

Drug residues have been reported in several environmental systems and are considered emerging contaminants [1] [2]. In aquatic environments, these contaminants, especially more stable and persistent substances, may present a risk to aquatic species [3]. A number of studies have indicated insufficient drug removal at water and effluent treatment stations [4] [5] [6], which highlights the importance of assessing the toxic effects of drug residues on aquatic species.

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is an antiretroviral belonging to the class of nucleotide analogs used in the treatment of HIV/AIDS and viral hepatitis. TDF is a prodrug, i.e. inactive substance hydrolyzed in vivo to release the active portion of the molecule, tenofovir (TFV) (Fig. 2.1). The prodrug is used to enhance tenofovir liposolubility and permeation across the intestinal cells.

**Fig. 2.1 Metabolism of tenofovir disoproxil**



After absorption by human organisms, TDF is de-esterified and after phosphorylation the TFV molecule acts as an inhibitor of the viral enzyme reverse transcriptase by competing with its natural substrate, adenosine 5'-monophosphate, thus disrupting DNA synthesis and, consequently, viral replication [7]. According to Kim et al. [8], after human use of this drug, up to 80% of the TFV is eliminated in unmodified urine, indicating its potential entry into domestic and hospital sewage in its active form. TFV is a very stable molecule [9], leading to concerns about the effects of this drug on aquatic species.

Residues of more than 20 antiretrovirals drugs have been detected in various environmental compartments such as wastewater effluent, river and lakewater, hospital effluent, groundwater, drink water, landfillleachates, at varying

concentrations depending on the antiviral drug [10] [11] [12]. The tenofovir have been described at low concentrations (145-243 ng.L<sup>-1</sup>) in surface waters from South Africa [13]. A study by Al-Rajab et al. [9] in London has shown that tenofovir is persistent in soils with no evidence of transformation products or microbial based degradation. The effects of TFV on DNA synthesis and its possible interference with metabolic pathways affecting viability and cell growth of other species are unknown, and its environmental impact needs to be investigated.

Although the importance of understanding the toxicity of chemical substances for aquatic species has been recognized, there is still limited information on the effects of most drugs on the environment [14]. Several factors are associated with the toxicity of drugs in the environment, including the selectivity of the drug for the target system, its interactions with other substances in the environment and its physicochemical characteristics, as well as the intrinsic sensitivity of the test system. Thus environmental toxicity can be assessed by applying tests using different test organisms belonging to at least two trophic levels [15].

Among the most commonly used test organisms are cyanobacteria. Cyanobacteria are widely studied because of their rapid response to environmental modifications, survival in polluted aquatic environments, and dominance among other species [16]. The cyanobacterium *Microcystis novacekii* is a ubiquitous unicellular photosynthetic prokaryote [17]. According to Bicudo and Menezes (2006) [18], *Microcystis* is the cyanobacterial genus with the widest distribution in Brazil, which justifies the use of species of this genus in toxicity tests .

*Artemia salina* is a widespread microcrustacean that forms a link between planktonic communities and higher levels of food chains. *A. salina* is considered an important model for the evaluation of toxicity and possible bioaccumulation of xenobiotics in the trophic chain [19] [20]. A third model, the bioluminescence test using the bacterium *Aliivibrio fischeri*, as test organisms, often used in environmental toxicity studies. *A. fischeri* is a gram-negative heterotrophic organism with widespread distribution. It is a saprophytic, free-living bacterium that uses dissolved or particulate organic matter from marine environments as a carbon source [21]. *A. fischeri* is characterized by light emission under favourable environmental conditions. *A.fischeri* is a very sensitive model for the evaluation of chemical toxicity because of its rapid response to environmental variations [15].

The objective of this study was to determine the inhibitors concentration of TDF for test organisms: *M. novacekii* (cyanobacteria), *A. salina* (microcrustaceans) and *A. fischeri* (bacteria)

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals tests**

The TDF sample used in this study were white dry powder, produced by Nortec Química, Brazil, (lot 507034) purity  $\geq 99\%$ , identified and certified by the Quality Control Laboratory of the Ezequiel Dias Foundation (FUNED). All solvents and reagents used were of analytical grade.

### **2.2 Test organisms**

The species *M. novacekii* was isolated at Rio Doce State Park and then identified and maintained in culture by the Laboratory of Limnology, Ecotoxicology and Aquatic Ecology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (LIMNEA/ICB/UFMG), Brazil. *A. Salina* hatching eggs (Maramar, lot 07) were purchased from a retail store in Belo Horizonte, Brazil. A freeze-dried *A. Fischeri* stock was purchased from Biolux®.

### **2.3 *M. novacekii* growth inhibition tests**

*M. novacekii* cultures were maintained in germination chambers at  $23.0 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 12 h light/12 h dark photoperiod under light intensity (radiance of  $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) [22]. The medium used for the cultivation and in the *M. novacekii* assays was ASM1 [23]. In total,  $750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS),  $\text{pK}_a = 7.2$  at  $25^\circ\text{C}$ , was added to freshly prepared and sterilized medium. The pH was adjusted to 7.0 with either  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl or NaOH solution. The optical densities of the cultures were determined by visible spectrometry at 680 nm ( $\text{OD}_{680}$ ) [24], and the correlation between the cell density (number of cells. $\text{mL}^{-1}$ ) and the absorbance was obtained by linear regression analysis.

For the *M. novacekii* growth inhibition tests, the OECD 201 protocol (2006) [25] was used, with some modifications. To cultures of *M. novacekii* with a cell density of  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>, TDF was added to obtain nominal concentrations of 40.00, 56.00, 78.40, 109.76, 153.66, 215.12, and 300.00 mg.L<sup>-1</sup>. This concentration range was defined from preliminary tests. The Erlenmeyer flasks were incubated in triplicate at  $25.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$  with a 12 h photoperiod and with constant stirring. Cell growth was monitored by OD<sub>680</sub> of the culture, measured at the initial time ( $T_0$ ) and then every 24 h. The pH was maintained in the range of 6.0 to 7.0 with MOPS buffer. Based on the growth curves, the mean growth rates were calculated, and the percentage growth inhibition curves were constructed as a function of the concentrations of TDF and TFV.

The growth rate coefficient ( $\mu$ ) for each culture (tests and controls) was calculated at 96 h according to the following equation:

$$\mu = \ln X_1 - \ln X_0 / t_1 - t_0$$

Where  $X_0$  and  $X_1$  are the number of cells (optical density) at 0 and 96 h, respectively;

$t_0$  denotes 0 days;  $t_1$  denotes the fourth day; and  $\mu$  is the average specific growth rate from the period (day<sup>-1</sup>).

#### **2.4 *A. salina* acute immobilization test**

A method adapted from Meyer et al. (1982) [26] was used in the *A. salina* assay. *A. salina* eggs were incubated under illumination for 36 h in a 3% saline solution (pH 8.0 to 9.0) until the formation of nauplii (larvae). Ten larvae were separated and transferred to test tubes containing 5.00 mL of TDF at the following concentrations in a saline solution: 30.00, 60.00, 90.00, 120.00, 150.00, and 180.00 mg.L<sup>-1</sup>

#### **2.5 Inhibition of bioluminescence of *A. fischeri***

To evaluate the inhibition of *A. fischeri* bioluminescence, the tests were performed according to ABNT NBR 15411-3 (2012) [27], the instrument used in the

test *A. fischeri* was Biofix®, ModeloLumi -10, Marcherey-nagel. The following nine serial dilutions of TDF in 2% NaCl were used: 4.38, 8.80, 13.20, 17.60, 18.48, 21.12, 26.40, 35.20, 52.80, and 70.40 mg.L<sup>-1</sup>. The cultures were incubated at 15.0°C for 15 min, and a 2% NaCl solution was used as a negative control [28] The loss of bacterial luminescence (INH%) due to the addition of toxic substances was calculated as follows:

$$KF = IC_t / IC_0$$

$$INH\% = 100 - (IT_t / KF.IT_0).100$$

where IC<sub>0</sub> and IT<sub>0</sub> are the luminescence of the control and test samples at t = 0, IC<sub>T</sub> and IT<sub>T</sub> are luminescence values for control and test samples measured after 15 min of exposure time, and KF is the correction factor based on the control/blank. R software was used to compare the intensities of the light emitted by the samples with the various dilutions of TDF and the control solution.

## 2.6 Data analysis

The statistical dose-response regression models represent the relation between the independent variable (dose or concentration) and the dependent variable (response or effect). Log-logistic, log-normal, and Weibull models were tested using the extension package drc for the statistical software R (version 3.4.2) to estimate the best fitting function [29].

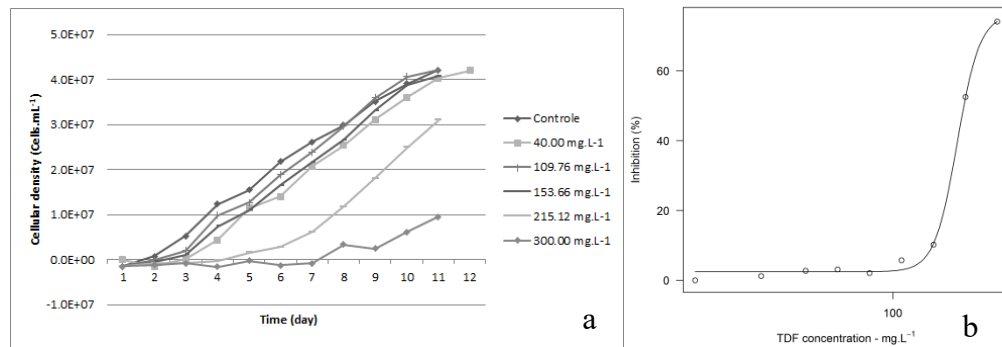
## 3. Results

The growth inhibition curves of *M. novacekii* exposed to TDF are shown in Fig. 2.2a. Based on the growth inhibition as a function of TDF concentrations (Fig. 2.2b), the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of TDF for *M. Novacekii* was estimated to be 161.01 (156.81; 165.21) mg.L<sup>-1</sup> at 96 h of treatment. This value refers to the TDF concentration; however, the results can be expressed as (TFV), because TDF is a prodrug and easily and spontaneously de-esterified in biological medium [30] [31]



for which the  $IC_{50}$  corresponded to 89.00 (86.67; 91.31)  $mg.L^{-1}$ . The  $IC_{50}$  model for TFV was found considering the stoichiometric calculation of the molar mass (MM) of tenofovir disoproxil (MM=519.4 g/mol) and the tenofovir (287.2 g/mol). The TFV is considered to be the active part of the molecule and the other concentration data is available in the literature, presented in terms of TFV.

**Fig. 2.2 Growth (a) inhibition (b) curves of *M. novacekii* exposed to increasing concentrations of TDF**



The immobility of *A. salina* nauplii was observed after 24 h and the inhibition of luminescence of *A. fischeri* after 15 minutes of exposure to TDF. The TDF and TFV concentrations affecting the viability of these species are shown in Table 2.1.

**Tabela 2.1 Resume of point estimates ( $mg.L^{-1}$ ) of  $IC_{50}$  of TDF and TFV determined for the tests and species used in this study**

#### 4. Discussion

Test organism	Parameters	$IC_{50}$ ( $mg L^{-1}$ )
<i>M. novacekii</i>	TDF Growth inhibition (cell density) 96 h	161.01 (156.81; 165.21)
	TFV	89.00 (86.67; 91.31)
<i>A. salina</i>	TDF Immobility 24 h	111.82 (103.18; 120.45)
	TFV	61.83 (57.05; 66.59)
<i>A. fischeri</i>	TDF Luminescence inhibition 15 min	14.83 (13.87; 15.79)
	TFV	8.20 (7.67; 8.73)

In this study, three trophic organisms were used: a cyanobacterium (primary producer), a crustacean (primary consumer) and a bacterium (decomposer), to estimate the environmental toxicity of tenofovir disoproxil.

#### **4.1 Toxicity of TDF to cyanobacterium *M. novacekii***

It was found in this study that *M. novacekii* showed resistance to TDF, tolerating concentrations higher than 100.00 mg.L<sup>-1</sup>. According to the criteria of the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS, 2017) [32], TDF can be considered as having a low acute toxicity for this strain.

Cyanobacteria as well as bacteria possess some metabolic systems similar to those of eukaryotic cells, with most enzymatic pathways present, including esterase enzymes [33]. Therefore, the toxicity of the antiviral drug may be expressed as that of TFV, because TDF is a pro-drug. The hydrolysis product (TFV) is the bioactive form of the drug binds reverse transcriptase by disrupting DNA synthesis drug [7]. Wood et al. (2015) [13] detected in the environment the active drug - TFV. In this case, there is a considerable reduction in the growth inhibitory concentrations, causing the TFV to be classified as category 3, i.e., having moderate environmental toxicity. The expression of toxicity in terms of TFV is also important because TDF is de-esterified in the human body and excreted as TFV (c.a. 80% of TDF absorbed) that can contaminate domestic sewage.

The results obtained in this study are similar to those reported by Russo et al. (2018) [34] for antiretroviral nucleoside analogues stavudine and zidovudine belonging the same group of TDF. According to those study, these drugs presented a weak inhibitory activity on *Raphidocelis subcapitata* growth, microalga specie very used in ecotoxicological studies.

The resistance of cyanobacteria to antivirals can be explained by morphological aspects such as mucilaginous production and the presence of cell walls. The phytoplankton biomass can also act as a biosorbent for hydrophobic organic pollutants [35] [36] [37]. The extracellular polymeric substances (EPS) present in mucilaginous layer, containing functional groups such as amine, carboxyl, and phosphate [38] can provide binding sites for the biosorption of hydrophilic

substances. Thus, EPS can retain xenobiotics in the mucilaginous layer, protecting the cell from toxic compounds.

#### **4.2 Toxicity of TDF to *A. Salina***

In this study, the IC<sub>50</sub> of TDF for *A. salina* was lower than the estimated IC<sub>50</sub> for *M. novacekii*. Other studies have already reported the same results in terms of the higher sensitivity of the *A. salina* model compared to a primary producer as a test organism [39] [40].

Although single-celled species are apparently more sensitive to xenobiotics, certain aspects of *A. salina* may explain its high sensitivity. *A. salina* is a known filtering organism that is able to bioaccumulate xenobiotics [41] [38]. This process can lead to higher intra-organism concentrations of xenobiotics than external concentrations. Furthermore, TDF may be more bioavailable in saline than in the ASM1 medium and may cross membranes, thereby increasing the concentration of the intracellular drug. We supposed that in intracellular medium, esterases of *A. salina* can hydrolyse TDF, releasing TFV.

Although the mechanism of toxicity of TFV to the crustacean *A. salina* has not been elucidated, many enzymes involved in the metabolic process of this species exhibit increased activity during larval development, including the adenosine triphosphatase activated by sodium and potassium (Na, K-ATPase) [42] [43] and hydrolases [44]. Ahmed-Ouameur et al. (2005) [45] have shown that AZT, another viral reverse transcriptase inhibitor, binds to Na, K-ATPase in vitro. This enzyme reaches very high levels in nauplii, and it is the main physiological mechanism of osmoregulation. Any disturbance in the activity of this enzyme can lead to organism death. It is possible that TFV may also interact with this crustacean enzyme, causing toxic effects. The elucidation of TFV toxicity mechanisms for this species was not the aim of this study; however, it is important to consider the characteristics of model organisms that may explain the sensitivity of the test.

### 4.3 Toxicity of TDF to *A. fischeri*

*A. fischeri* was very sensitive to TDF, which is an important aspect to consider. TFV has great chemical stability in the environment and is biodegraded slowly [46] [47] [48]. *A. fischeri* is a saprophyte bacterium; therefore, it can be proposed that TFV can potentially affect biological processes in aerobic treatment systems.

An initial increase in bioluminescence was observed in the test with *A. fischeri*. This effect has been described for several species under stress conditions and is attributed to the hormesis phenomenon, a process that stimulates the metabolism of toxic chemicals at very low concentrations. Mennillo et al. (2018) [49] investigated the ecotoxicological properties of ketoprofen, an anti-inflammatory drug, and reported a hormetic effect on *A. fischeri* exposed to ketoprofen.

Although *A. fischeri* is more sensitive to TDF than the other organisms in this study, other researchers have obtained different results. Maselli et al. (2015) [50] compared the sensitivities of different ecotoxicity tests for crude and treated effluents from the pharmaceutical industry and found that the crustacean *Daphnia similis* and the microalga *Raphidocelis subcapitata* were more sensitive as indicators of toxicity than *A. fischeri*. The same observation was made by Minagh et al. (2009) [51] regarding the toxicity of sertraline to *A. fischeri* and *Daphnia magna*, with the latter being the more sensitive species.

The variation in the toxicity of a chemical compound for different test organisms species is due to differences in the interaction between the substance and the target system of each species studied, the time of exposure, and the ability of the organisms to recover during and after exposure. Therefore, to evaluate environmental toxicity, the use of several test organisms is recommended because species maintain different mechanisms of resistance to xenobiotics, and the use of organisms from different trophic levels may reveal a cascading effect of a chemical on the aquatic ecosystem.

Environmental studies on the impact of TFV on aquatic biota have not been described in the literature, despite the presence of the drug at low concentrations (145-243 ng.L<sup>-1</sup>) in surface waters in South Africa [13]. It is emphasized that no risk is expected for this drug at the concentrations already detected in the environment. However, investigations about toxic effects of this drug are very important because TDF has many uses (hepatitis, prevention of HIV infection and treatment of HIV-

infected patients) and may be an environmental problem in the future. It should also be noted that TDF is a drug that inhibits DNA replication and may also act on other non-target species with serious ecological impacts.

## 5. Conclusion

According to the organism bioindicators used to estimate TDF toxicity, *A. fischeri* was the most sensitive model to the toxic effects of TDF, while *M. novacekii* (Cyanobacteria) and *A. salina* (crustacean) were moderately sensitive to the drug.

This result is worrying because *A. fischeri* is saprophytic; thus, this can indicate possible injurious effects on the others decomposer organisms, possibly inhibiting drug biodegradation.

TFV is a very stable molecule, and biodegradation inhibition can contribute to enhancing the persistence of this drug in the environment.

Although TDF has shown moderate toxicity to the other organisms tested, algae and crustaceans, this does not mean that the drug is environmentally safe. It is necessary to consider the stability and low solubility of TFV in aqueous medium. This drug could accumulate in the environment and bioaccumulate in aquatic organisms. In addition, it should be emphasized that active pharmaceutical compounds are normally present as mixtures in aquatic environments.

In HIV treatment, TDF is mainly administered in association with other antiviral drugs. Thus, additive or potentiating toxic effects can still occur, increasing damage to the ecosystem.

The present results highlight that a battery of bioassays representing different trophic levels is fundamental in predicting the toxicity of drugs, regardless of whether significant variations can occur between species tests. Furthermore, the tests provide the information required to define safe levels of drugs for living organisms in the environment. In addition, the physicochemical properties of TFV and the toxicity to the species tested in this study indicate the need to investigate the presence of this drug on the environment, its persistence after effluent treatment and potential disturbances in the equilibrium of aquatic ecosystems.

**Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval**

This article does not contain any studies with human participants or vertebrate animals performed by any of the authors.

**Acknowledgements**

This study was funded by the Minas Gerais State Agency for Research and Development– FAPEMIG (process n. CEX - APQ-01626-14)

The authors thank Professor Liséte Celina Lange and Dra Raquel Sampaio Jacob of the Engineering School of f UFMG in their collaboration for this study.

## References

- [1] López-Doval, J. C., Montagner, C. C., Albuquerque, A. F., Moschini-Carlos V., Umbuzeiro, G., Pompêo, M. (2017). Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: spatial distributions and risk assessment. *Science of The Total Environment*, 575, 1307–1324.
- [2] Schaider, L. A., Rudel, R. A., Ackerman, J. M., Dunagan, S. C., Brody, J. G. (2014). Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Science of The Total Environment*, 468-469, 384–393.
- [3] Rimayi, C., Odusanya, D., Weiss, J. M., Boer, J., Chimuka, L. (2018). Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the Mngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa. *Science of The Total Environment*, 627, 1008–1017
- [4] Godoy, A. A., Kummrow, F., Pamplin, P. A. (2015). Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere*, 138, 281-91.
- [5] Agunbiade, F. O., Moodley, B. (2016). Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(1): 36-46.
- [6] K'oreje, K. O., Vergeynst, L., Ombaka, D., De Wispelaere, P., Okoth, M., Van Langenhove, H., Demeestere, K. (2016). Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere*, 149, 238- 44.
- [7] Kearney, B. P., Flaherty, J. F., Shah, J. (2004). Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(9), 595–612.
- [8] Kim, Y. K., Choi, M. J., Oh, T. Y., Yu, K.-S., & Lee, S. (2017). A comparative pharmacokinetic and tolerability analysis of the novel orotic acid salt form of tenofovir disoproxil and the fumaric acid salt form in healthy subjects. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 3171–3177.
- [9] Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Chapman, R. Lapen D. R., Topp E. (2010). Fate of the antiretroviral drug tenofovir in agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 408, 5559-64.
- [10] Ncube, S. Madikizel, L. M. Chimuka, L., Nindi, M. M. (2018). Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. *Water Res* 145: 231-247. <https://doi:10.1016/j.watres.2018.08.017>

- [11] Prasse, C., Schlüsener, M. P., Schulz, R. Ternes, T. A. (2010). Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance? *Environmental Science & Technology*, 44(5):1728–1735.
- [12] Jain, S., Kumar, P., Vas, R. K. (2013). Occurrence and removal of antiviral drugs in environment: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224,1410-3.
- [13] Wood, T. P., Duvenage, C. S. J., & Rohwer, E. (2015). The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. *Environmental Pollution*, 199, 235–243.
- [14] Taylor, D., Senac, T. (2014). Human pharmaceutical products in the environment - the "problem" in perspective. *Chemosphere*, 115, 95-9.
- [15] Ghosh, P., Thakur, I. S., Kaushik, A. (2017). Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 259-270.
- [16] El-Bestawy, E. A., Ab El-salam, A. L., Mansy, A. E. R. (2007). Potencial use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59 (3):180-192.
- [17] Bukaveckas, P. A., Franklin, R., Tassone, S., Trache, B., Egerton, T. (2018). Cyanobacteria and cyanotoxins at the river-estuarine transition. *Harmful Algae*,76, 11-21.
- [18] Bicudo, C., E., M., Menezes, M., (2006) Gêneros de algas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. RiMa, São Carlos.
- [19] Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., Celik, F.(2016 ). Toxicity of Engineered Nickel Oxide and Cobalt Oxide Nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227:70-78 .
- [20] Rajabi, S., Ramazani, A., Hamid, M., Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1).
- [21] Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-UI-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A.,Shar, G. A., Asif Tahir, M., Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* BioluminescenceInhibition Assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment* , 626,1295-1309.
- [22] Fioravante, I. A., Albergaria, B., Teodoro, T. S., Starling, S.M., Barbosa, F., Augusti, R. (2012). Removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol from a sterile WC medium by the cyanobacteria *Microcystis novacekii*. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(9):2362-6.
- [23] Gorham, P. R., McLachlan, J., Hammer, U. T., Kim, W. K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *SIL Proceedings* 15:796-804.



- [24] Ma, J., Lin, F., Qin, W., Wang, P. (2004). Differential response of four cyanobacterial and green algal species to triazophos, fentin acetate, and ethephon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(5): 890–897.
- [25] OECD (2006). Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Organization for Economic Cooperation and Development - Guidelines for testing chemicals. (201).
- [26] Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., Mclaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(05): 31–34.
- [27] Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (2012) NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente). Rio de Janeiro, 23p.
- [28] Oller, I., Gernjak, W., Maldonado, M. I., Pérez-Estrada, L. A., Sánchez-Pérez, J. A., Malato, S. (2006). Solar photocatalytic degradation of some hazardous water-soluble pesticides at pilot-plant scale. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3): 507–517.
- [29] Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12):1-13.
- [30] Yuan L, Dahl T C, Oliyai R (2001) Degradation Kinetics of Oxycarbonyloxymethyl Prodrugs of Phosphonates in Solution. *Pharmaceutical Research* 18(2): 234–237. <https://doi:10.1023/a:1011044804823>
- [31] Brooks K M, Ibrahim M E, Castillo-Mancilla J R, MaWhinney S, Alexander K, Tilden S, Kerr B J, Ellison L, McHugh C, Bushman L R, Kiser J J, Hosek S, Huhn G D, Anderson P L (2019). Pharmacokinetics of tenofovir monoester and association with intracellular tenofovir diphosphate following single-dose tenofovir disoproxil fumarate. *J Antimicrob Chemother* <https://doi:10.1093/jac/dkz187v>.
- [32] GHS (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. United Nations, New York.
- [33] Panda, T., Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2): 160–169.
- [34] Russo, D., Siciliano, A., Guida, M., Andreozzi, R., Reis, N. M., Li, Puma G. L., Marotta, R. (2018). Removal of antiretroviral drugs stavudine and zidovudine in water under UV<sub>254</sub> and UV<sub>254</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes: Quantum yields, kinetics and ecotoxicology assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 349, 195–204.
- [35] Gao, J. F., Zhang, Q., Wang, J. H., Wu, X. L., Wang, S. Y., Peng, Y. Z. (2011). Contributions of functional groups and extracellular polymeric substances on the biosorption of dyes by aerobic granules. *Bioresource Technology*, 102 (2):805-13.

- [36] Wang, Z., Hessler, C. M., Xue, Z., Seo, Y. (2012). The role of extracellular polymeric substances on the sorption of natural organic matter. *Water Research*, 46(4): 1052–1060.
- [37] Bai, L., Xu, H., Wang, C., Deng, J., Jiang, H. (2016). Extracellular polymeric substances facilitate the biosorption of phenanthrene on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere*, 162,172-180..
- [38] More, T. T., Yadav, J. S., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1–25.
- [39] Oliveira-Filho, E. C., Paumgarten, F. J. (2000). Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamidetosnails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3): 342–350.
- [40] Bhuvaneshwari, M., Thiagarajan, V., Nemade, P., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2018). Toxicity and trophic transfer of P25 TiO<sub>2</sub> NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: Effect of dietary and waterborne exposure. *Environmental Research*, 160, 39-46.
- [41] Riisgard, H. U., Jeune, N., Pleissner, D., Zalacáin, D., Lüsrow, F., Wiersma, J. B. (2015). Adaptation of the brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) to filter-feeding: effects of body size and temperature on filtration and respiration rates. *Journal of Crustacean Biology*, 35(5): 650–658.
- [42] Fisher, J. A., Baxter-Lowe, L. A., Hokin, L. E., (1986). Regulation of Na,K-ATPase biosynthesis in developing *Artemia salina*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(2):515-9.
- [43] Peterson, G. L., Ewing, R. D., Conte, F. P. (1978). Membrane differentiation and de novo synthesis of the (Na + + K +)-activated adenosine triphosphatase during development of *Artemia salina* nauplii. *Developmental Biology*, 67(1): 90–98.
- [44] Miralles, J., Sebastian, J., Heredia, C. F. (1978). Independent temporal expression of two N-substituted aminoacyl-tRNA hydrolases during the development of *Artemia salina*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 518(2):326-33.
- [45] Ahmed-Ouameur, A., Neault, J. F., Claveau, S., Tajmir-Riahi, H. A. (2005). AZT binding to Na,K-ATPase. *Cell Biochem Biophys*, 42(1):87-94.
- [46] Havele, S., Dhaneshwar, S. R. (2012). Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of tenofovir disoproxil fumarate in pharmaceutical formulation. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 34(6): 615-622.
- [47] Shashi Kumar, B. M., Rajkamal, B. (2017). A simple, selective, rapid and rugged method development and validation of tenofovir and rilpivirine in human plasma

using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(7): 605-613.

- [48] Agrahari, V., Putty, S., Mathes, C., Murowchick, J. B. & Youan, B. B. C. (2014). Evaluation of degradation kinetics and physicochemical stability of tenofovir. *Drug Testing and Analysis*, 7(3):207-13.
- [49] Mennillo, E., Arukwe, A., Monni G., Meucci, V., Intorre, L., Pretti, C. (2018). Ecotoxicological properties of ketoprofen and the S(+)-enantiomer (dexketoprofen): Bioassays in freshwater model species and biomarkers in fish PLHC-1 cell line. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1): 201–212.
- [50] Maselli, B. S., Luna, L. A., Palmeira, J. O., Tavares, K. P., Barbosa, S., Beijo, L. A., Umbuzeiro, G. A., Kummrow, F., (2015). Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical company: a comparison of the sensitivities of different standardized tests. *Ecotoxicology*, 24(4):795-804.
- [51] Minagh, E., Hernan, R., O'Rourke, K., Lyng, F. M., Davoren, M. (2009). Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2): 434–44.

## CAPÍTULO 3

### Removal of antiviral Tenofovir disoproxil in water using biodegradation by cyanobacteria and treatment via an advanced oxidation process

Sandra R. Silva,<sup>a</sup> Carolina P. S. Moreira,<sup>b</sup> Olivia M. S. R. Vasconcelos,<sup>b</sup> Francisco A. R. Barbosa,<sup>c</sup>  
Marcos P. G. Mol,<sup>b</sup> Sergia M. S. Magalhães<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Social Pharmacy, Pharmacy School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Research Department. Ezequiel Dias Foundation. Belo Horizonte, Brazil.

<sup>c</sup>Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

#### **Abstract**

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is an antiretroviral drug from the class of nucleotide analogues extensively used by people living with HIV/AIDS. This study evaluated tenofovir disoproxil biodegradation by cyanobacterium *Microcystis novacekii* and degradation via an advanced oxidation process using Fenton's reagent. Concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0 mgL<sup>-1</sup> TDF were used in the experiments. In the first step TDF was de-esterified by biodegradation, forming a tenofovir monoester intermediate. Approximately 90% (88.7 to 94.1%) of the drug and their intermediates were removed from the culture medium over 16 days. De-esterification with formation of the monoester and other degradation products were also observed with the oxidation process using Fenton's reagent. After two hours of reaction, the total drug removal of tenofovir and the monoester ranged from 93.0 to 98.0%, depending on the initial concentration. For both methods, TDF was significantly removed, and thus, both methods are promising for the treatment of these drug residues. The methods used were not able to remove the tenofovir disoproxil and their intermediates completely, and thus there is a need to optimize these processes for the treatment of effluents from drug production so as to reduce their possible environment damage.

**Key-words:** Drugs, nucleotide analogues, degradation, *Microcystis novacekii*, Fenton's reaction

## Introduction

In recent decades, issues related to water contamination have become a global concern. In this context, the dispersion of pharmaceutical residues in the aquatic environment has been the target of numerous studies due to the presence of biologically active molecules these residues. Previous studies have indicated the presence of drug residues in several environmental matrices, such as sewage, surface and treated waters.<sup>1-8</sup> The drugs unpredictable environmental effects on the exposed species maybe an ecological risk.<sup>9-13</sup>

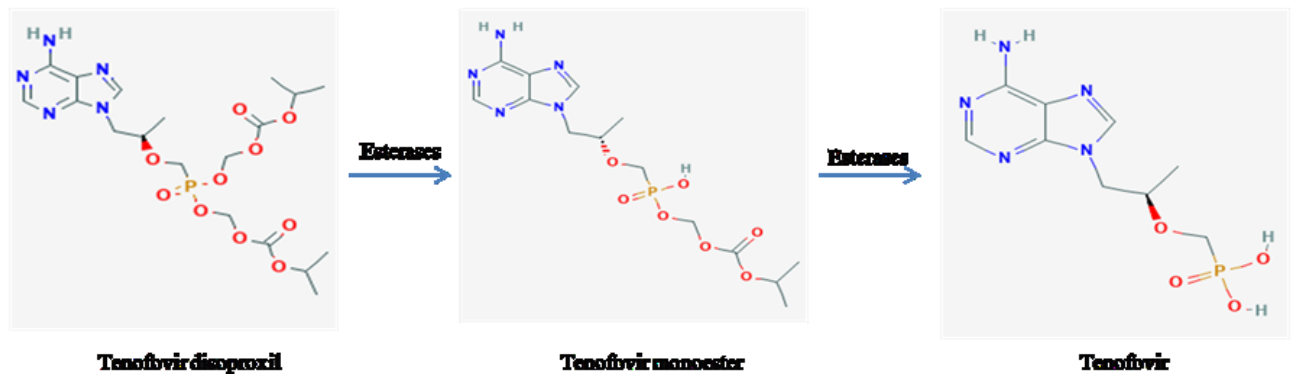
Concern over drug residues from pharmaceutical waste is justified because, even if it is only na occasional occurrence, its volume of residues can be significant. Fick *et al.*<sup>14</sup> reported that in an industrial park in India, where there is the largest global production of generic drugs, all the waters of the region were contaminated by drug's residues. Furthermore, the incomplete removal of drugs from liquid effluents is common in conventional industrial waste treatment stations<sup>15-16</sup> and discharge of the effluent into receiving water bodies is a relevant environmental problem.<sup>17-20</sup>

The presence of antiretrovirals (ARVs) in the environment is an issue of concern. According to Gregson *et al.*<sup>21</sup> more than 35 million people worldwide are living with HIV/AIDS (UNAIDS)<sup>22</sup> and control of the pandemic depends on continuous antiretroviral therapy. The chronic use of ARVs implies in an extensive production, which generates interest in the liquid effluents from the pharmaceutical industry and requiring the development of effective methods for treating pharmaceutical waste.

The presence of ARVs in the environment has been reported in different countries.<sup>23-27</sup> Studies by Fekadu *et al.*<sup>23</sup> and Wood *et al.*<sup>8</sup> indicated the presence of ARVs, as well as other drugs, in surface waters in South Africa and Kenya at much higher concentrations than those found in Europe, where Aminot *et al.*<sup>28</sup> identified low concentrations of the ARVs lamivudine, nevirapine and ritonavir in France in waste water.

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is one of the drugs recommended by the World Health Organization (WHO) as a first-line treatment for HIV/AIDS, combined with other antiretroviral drugs, for life-long use by all HIV-infected individuals,<sup>19</sup> justifying concern about apprehension over the disposal of residues from its production and its environmental effects.

Tenofovir is an analogue of the nucleotide adenosine 5'-monophosphate and acts by inhibiting the enzyme reverse transcriptase. Due to the low lipid solubility of tenofovir, it is administered as a prodrug in esterified form and is de-esterified intracellularly to release the active portion of the molecule, tenofovir (Fig.1). De-esterification may also occur in the gastrointestinal tract via chemical or enzymatic processes, causing the drug to present low oral bioavailability, approximately 25% at fasting.<sup>29-31</sup> After absorption, up to 80% of the administered dose can be eliminated through urine in intact form<sup>32</sup> indicating great resistance of the drug to metabolization by biological systems. Hence, due to the stability of tenofovir, treatment of the effluent from drug production processes is a challenge for the pharmaceutical industry.



**Fig. 3.1** Metabolism of the prodrug tenofovir disoproxil with formation of the de-esterification products: tenofovir monoester and tenofovir

Effluent treatment technologies that employ individual or groups of microorganisms are some of the most commonly used processes for biodegradation of organic compounds. In recent years, the use of cyanobacteria and microalgae species has attracted interest on account of processes using the carbon-fixing, photosynthesizing organisms are considered more sustainable than conventional technologies, such as anaerobic processes, and, thus, are a potential solution for degradation of residues from various pollutants in wastewaters.

Phytoplanktonic species, isolated or in combination with other microorganisms, have the ability to degrade different types of chemical compounds.<sup>33-37</sup> Cyanobacteria of the genus *Microcystis* are photosynthesizing prokaryotes that exhibit rapid responses to environmental changes.<sup>38-39</sup> Certain

strains of the genus *Microcystis* survive in polluted aquatic environments, acting in a dominant manner over other species. According to Bicudo and Menezes<sup>40</sup> this genus is one of the most common genus found in Brazilian eutrophic waters.

From the perspective of developing wastewater treatment methods, *Microcystis* strains are a straight forward option, justifying study of their potential for removal of drug residues in aquatic environments. *Microcystis novacekii* has demonstrated resistance and ability to biodegrade different types of pollutants.<sup>41-42</sup>

The removal of drug residues from liquid effluents through physicochemical methods is also widely used for optimization of treatment processes and may be combined with biodegradation to increase the efficiency of clearance of aquatic pollutants.<sup>43-44,16</sup> Advanced oxidation processes (AOPs) are particularly applicable to the removal of molecules recalcitrant to conventional effluent treatments, such as activated sludge and by-products of anaerobic processes.<sup>45-47</sup> AOPs encompass different processes that occur through the production of extremely reactive and poorly selective radicals. These processes reduce the organic load and are applicable to effluents from the pharmaceutical industry.<sup>48-50</sup>

Fenton's reagent is one of the most commonly used AOPs due to its easy operability, using easily accessible and energy-free inputs<sup>51</sup>. The method consists of generating of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of a catalyst. Radicals interact with organic compounds, promoting breaks and additions to the organic molecules in a chain reaction whose final goal is the total degradation of the organic compound.<sup>52-53, 48, 54</sup>

Although the presence of antiretroviral drugs has been reported in aquatic environments, few studies on the removal of these drugs have been published, justifying the development of research in this area. No studies on biodegradation or degradation by Fenton's reagent were found for TDF. Thus, the objective of this study was to evaluate the biodegradation of tenofovir disoproxil using a culture of *M. novacekii* cyanobacteria and degradation using an advanced oxidation process with Fenton's reagent.

## Materials and methods

### Reagents and Chemicals

The tenofovir disoproxil fumarate used in the experiments was obtained from Nortec Química (lot 507034) as a white, amorphous solid. The drug was analysed and certified by the department of quality control of the Ezequiel Dias Foundation (FUNED). The reagents, solvents and other chemicals used were of analytical or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. The TDF stock solution ( $2.5 \text{ gL}^{-1}$ ) was prepared using type 1 water.

### *M. novacekii* culture

The *Microcystis novacekii* strain was isolated from the Doce River State Park, Minas Gerais, Brazil. The species was identified and cultured at the Laboratory of Limnology Ecotoxicology and Aquatic Ecology-LIMNEA/ICB/UFMG.

The bacteria *Lactobacillus casei* associated with the *M. Novacekii* strain was identified by the Neoprosecta Microbiome Technologies Company using next-generation sequencing (NGS) of amplicons and Neobiome software.<sup>55</sup>

### *M. novacekii* culture medium

ASM1 medium<sup>56</sup> buffered by the addition of  $750 \text{ mgL}^{-1}$  3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), pKa 7.2, was used for *M. novacekii* culture and experiments, and cultures were maintained at  $25^\circ\text{C}$ . The pH was adjusted to 7.0 with  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl or NaOH solution.

The composition of the ASM1 medium was as follows ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (170.00),  $\text{CaCl}_2$  (29.00),  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (41.00),  $\text{MgSO}_4$  (49.00),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (8.70),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (17.80),  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $9.5\times 10^{-3}$ ),  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $6.5\times 10^{-4}$ ),  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.69),  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.35),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (1.24),  $\text{FeCl}_3\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0.54), EDTA  $\text{Na}_2$  (3.72).



### **TDF biodegradation by *M. novacekii***

The TDF biodegradation tests by the cyanobacterium *M. novacekii* were carried out following the OECD protocol - Guidelines for testing of chemicals (2003).<sup>57</sup>

Non-axenic *M. Novacekii* cultures in buffered ASM1 medium (100mL) were incubated at  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  under constant agitation with a 12 h photoperiod ( $0.098 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  irradiation). The cell density was evaluated by optical density (680 nm), and was monitored until cultures with approximately  $10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$  were obtained. TDF solution was added to the flasks to obtain concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0  $\text{mgL}^{-1}$  TDF in the cultures. Culture samples without the addition of TDF and of TDF solution in ASM1 medium without cyanobacteria were used as controls. Experiments were performed in triplicate. Aliquots of 5 mL were collected from the samples and controls at the initial time  $T_{(i)}$  and at 1, 3, 7 and 16 days for detection of tenofovir disoproxil and metabolites.

### **Extraction of TDF and its metabolites from culture medium**

The samples were subjected to solid-phase extraction using a Phenomenex Strata-X® cartridge (Phenomenex, USA). The cartridges were conditioned with 5 mL of type 1 water. The samples were transferred to the cartridge and eluted with 5 mL of 5% methanol solution, followed by pure methanol. The eluate was filtered (Millipore Filter, 0.22  $\mu\text{m}$  pore size) and transferred to a vial with an insert and injected into a liquid chromatographer coupled to a mass spectrophotometer for HPLC quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC/Q-TOF-MS) analysis.

### **TDF degradation via oxidation with Fenton's reagent**

The assays were performed in triplicate in a climate-controlled room at  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . The degradation battery of tests consisted of the addition of solid ferrous ammonium sulphate at a ratio of 1:5 ( $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$ ; w/w) to TDF solutions (12.5, 25.0 and 50.0  $\text{mgL}^{-1}$ ) under agitation. The pH was adjusted to 2.8-2.9 with 0.1  $\text{molL}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution.<sup>58</sup> Fractional addition of peroxide was performed, starting with 25% of the stoichiometric ratio, with the aim of obtaining the final degradation and

degradation products during the process.<sup>58-61</sup> The reaction was interrupted by addition of sodium bisulphite ( $0.1\text{molL}^{-1}$ ). The aliquots were collected at intervals previously established at initial time, 2, 5, 20, 35, 45, 60, 75, 105 and 120 minutes of reaction time. To equalize the values of each one of the collected rates, the volumes of  $\text{H}_2\text{O}_2$  added and the volumes collected from the samples during the process were taken into consideration. A complexometric method with ammonium metavanadate<sup>62</sup> was used for determining the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration with a WW GII 03A spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. Samples taken during the experiments were centrifuged at 13.000 rpm for 30 min. The obtained supernatant was transferred to vials.

The presence of tenofovir disoproxil and other by-products was determined using HPLC/Q-TOF-MS analysis. The total organic carbon (TOC) was determined using a total organic carbon analyser (Shimadzu, model TOC VCOH) via catalytic combustion at  $680\text{ }^\circ\text{C}$ .

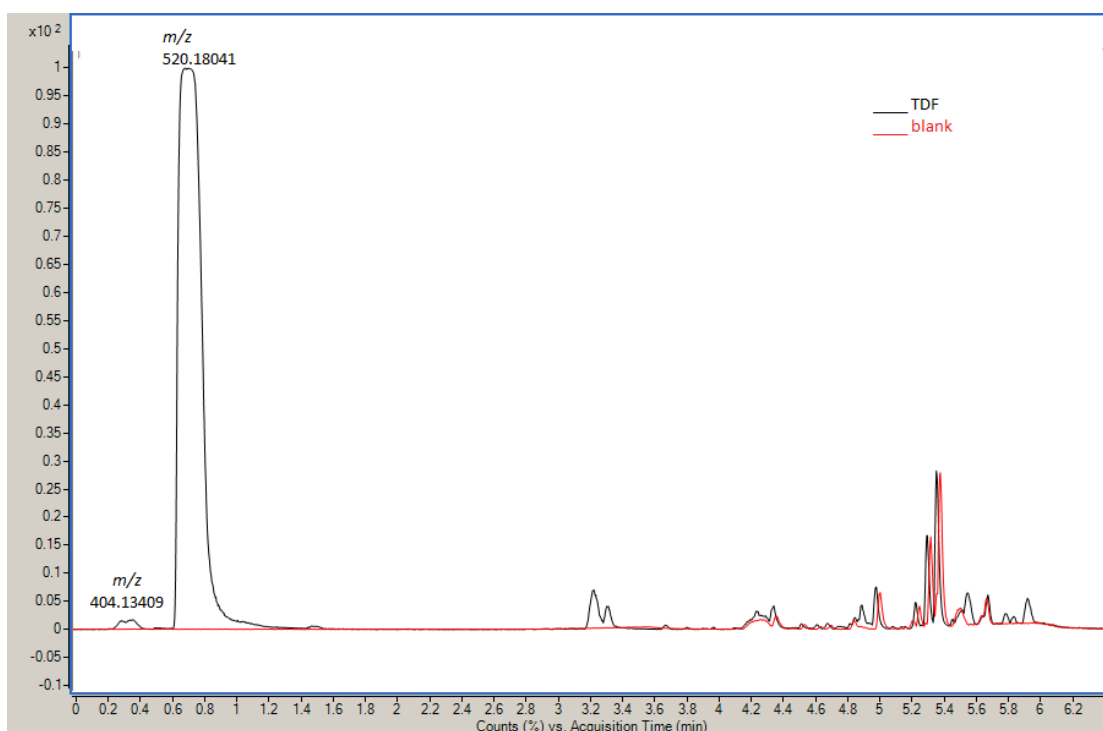
### **HPLC/Q-TOF-MS HPLC analysis**

A HPLC–QTOF-MS system (6540 UHD Accurate Mass Q-TOF LC/MS equipped with Agilent Mass Hunter Workstation Data Acquisition software) was used and experimental conditions were Zorbax Eclipse Plus C18 column ( $2.1 \times 50\text{ mm}$ ; particle size  $1.8\text{ mm}$ ); flow rate  $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; mobile phase methanol: water, both with  $0.1\%$  formic acid in gradient elution ( $50\%$  of methanol for 2 min and  $50\text{-}100\%$  methanol in 3 min and then return to  $50\%$  of methanol in 1.5 min, total of 6.5 min); injection volume  $4\text{ }\mu\text{L}$ , temperature of  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . ESI parameters were capillary voltage  $3.5\text{ kV}$  for positive mode; gas temperature  $325\text{ }^\circ\text{C}$ ; drying gas  $8\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; fragmentor  $175\text{V}$ ; skimmer  $65\text{V}$ ; mass range from  $100\text{-}1000\text{ }m/z$  and no collision energy was used. The TDF calibration curve was prepared in triplicate in water, with concentrations ranging from  $0.1$  to  $125\text{ mgL}^{-1}$ , followed by filtration ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ).

### **Results and discussion**

The chromatographic and spectrometric analysis parameters were determined using an aqueous TDF solution ( $50.0\text{ mgL}^{-1}$ ) analysed via HPLC-ESI-Q-TOF/MS. In the final method developed utilizing a gradient the presence of two peaks was observed

in the chromatogram (Fig. 2) main peak (0.7min) and other residual peak (0.3 min). For characterization of the peaks, the isolated ions in the mass spectrum were extracted, and the corresponding chemical structure was proposed based on the exact mass obtained. Thus, the peak in the retention time of 0.7 min was attributed to tenofovir disoproxil. Peak at 0.3 min, with  $m/z$  404.13 was attributed to protonated tenofovir monoester, with the fragmentation patterning in mass as described by Kurmi *et al.*<sup>64</sup> and peak at 0.7 min, with  $m/z$  520,18 attributed to the protonated main compound TDF [ $M+H^+$ ]. No fragment derived from the fragmentation of tenofovir disoproxil was observed in the final minutes (after 4 min), as peaks that appears came from the gradient elution.



**Fig. 3.2** Chromatogram of TDF ASM1 medium ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ); ( $m/z$  404.13) monoester of tenofovir and ( $m/z$  520.18) tenofovir disoproxil

According to Kurmi *et al.*<sup>63</sup> the partial hydrolysis product mono-esterified tenofovir is an impurity specified in The United States Pharmacopeia (USP, 2011)<sup>64</sup> and The International Pharmacopoeia (2015).<sup>65</sup>

TDF stability was evaluated using controls containing TDF ( $12.5$  and  $50.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) in ASM1 medium. These controls were monitored for 16 days and an increase

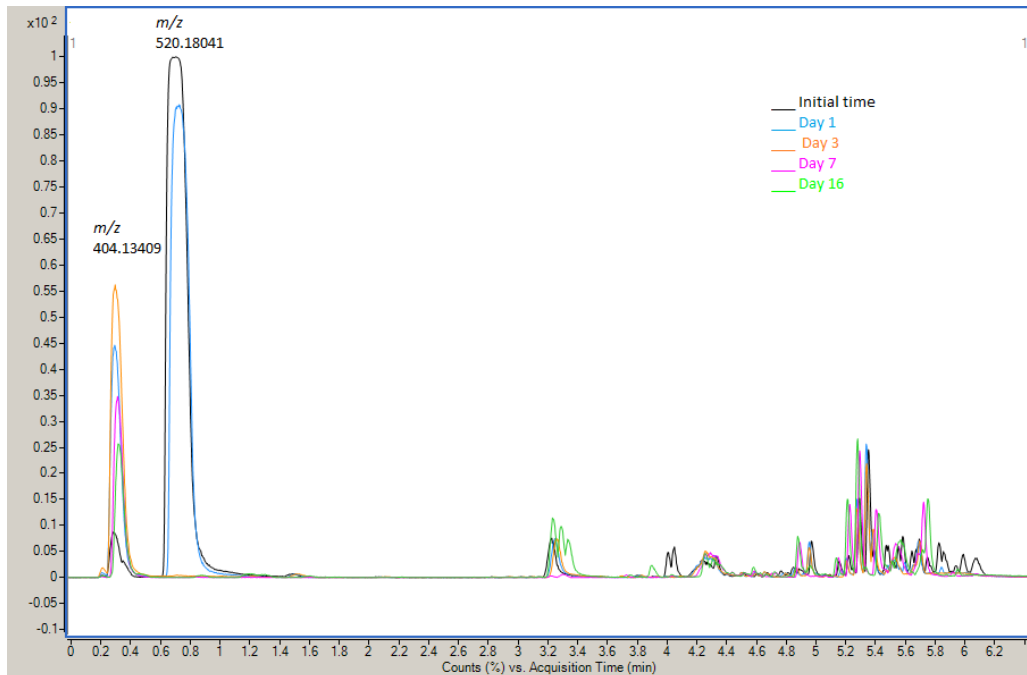
in the peak relative to the monoester was observed throughout the experiment and at the end of the process all the TDF was converted in tenofovir monoester.

This result indicates that partial de-esterification may occur spontaneously in ASM1 medium. The ASM1 medium is a mineral medium containing various salts, and the experiment was performed in buffered medium (pH 7-8). These conditions possibly favour de-esterification of the molecule, which was observed at all concentrations. According to Yuan,*et. al.*<sup>66</sup> TDF has greater stability in acidic pH (2 to 3). Silva<sup>67</sup> in study of stability of TDF reported that hydrolysis can occur in neutral or alkaline pH. The pH dependence of *in vitro* chemical degradation of phosphonate nucleotide analogues, such as TDF, was also described by Yuan *et. al.*<sup>66</sup> who studied the degradation kinetics of oxycarbonyloxymethyl prodrugs of phosphonates and observed hydrolysis product formation as a function of pH increase.

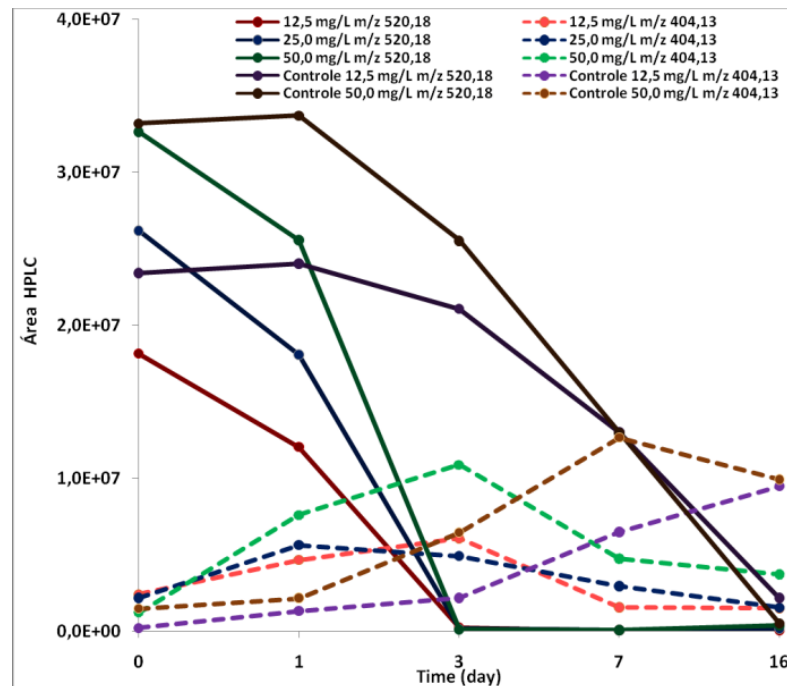
#### **TDF biodegradation in *M. novacekii* cyanobacteria culture**

In TDF biodegradation experiments with *M. novacekii* cultures, a rapid reduction in the peak area attributed to tenofovir disoproxil and an increase in the area corresponding to the mono-de-esterification product were observed (Fig.3). Integration of the peaks areas indicated that TDF mono-de-esterification occurred rapidly in the presence of cyanobacteria. Simultaneously, the chromatographic peak related to the monoester showed decay, and on the sixteenth day, approximately 90% of the tenofovir disoproxil and its monoester have been removed from the medium, while in control the monoester remained in the medium, indicating the likely biodegradation of these compounds.

De-esterification was found to be much more intense and rapid in cultures than in the control, indicating that metabolic factors contributed by the microorganisms present accelerated the de-esterification process. Slow remotionof tenofovir monoester in the tests was observed up to day 16 of the experiment, with a total removal rate of 88.7%( 50mg.L<sup>-1</sup>), 91,8 (12,5mg.L<sup>-1</sup>) and 94.1% (25mg.L<sup>-1</sup>) (Fig. 4).



**Fig. 3.3** Tenofovir disoproxil and monoester of tenofovir removal during cyanobacteria degradation process in sample of  $50 \text{ mg.L}^{-1}$



**Fig. 3.4** Evolution of the peak areas at  $m/z$  520.18 and  $m/z$  404.13 obtained via HPLC/MS during TDF (at concentrations of 12.5, 25.0 and  $50.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) biodegradation by *M. novacekii*

The possible metabolic pathways for biodegradation of tenofovir disoproxil and its respective monoester by cyanobacteria seem to be esterase-dependent as it allows the release of the tenofovir. In human organism these enzymes have a key role in de-esterification of the drug and release of the active compound, and the same can be proposed to cyanobacteria metabolism. According to Zang *et. al*<sup>68</sup> the production of esterases by cyanobacteria can be enhanced when they are exposed to stress conditions, such as a medium rich in xenobiotics. The TDF is an analogue of the nucleotide adenosine 5'-monophosphate.<sup>45,69</sup> Notably, one of the determining factors for cyanobacterial growth is the presence of phosphate. Phosphate uptake from organic compounds has been described for cyanobacteria<sup>70,71</sup> and can be involved in the process of uptake of tenofovir disoproxil and its metabolites by cyanobacteria. Another possibility is the participation of mucilage in process of the removal of organic compounds from the environment by cyanobacteria.<sup>72,73</sup> The *M. novacekii* strain used is a large mucilage producer. The mucilaginous layer is rich in sulphate and phosphate groups, and thus, it is possible that there are interactions of this groups with the tenofovir disoproxil molecule and its de-esterified.<sup>74-77</sup>

In the experiment, rapid formation of the tenofovir monoester was observed, and this first step probably occurs in the extracellular medium. Brooks *et. al*.<sup>78</sup> indicate that de-esterification reduces but does not prevent transmembrane transport of the monoester in humans. Further, to a lesser extent than tenofovir disoproxil, the tenofovir monoester also transposes the membrane of intestinal cells, which may be assumed to occur in *M. novacekii* as well. Due to their structural similarity, once in the intracellular environment, the degradation of tenofovir likely occurs through an enzymatic pathway similar to that of the natural nucleotide as the enzymes that catabolize endogenous products have low specificity.<sup>79,45,69</sup>

The presence of residual concentrations of the tenofovir monoester derivative at the end of the experiment was observed for all tested concentrations. However, for the concentration of 25 mgL<sup>-1</sup> a degradation of 94% of the drug was obtained, with the presence of only very small amounts of other products in the medium, which is a very promising result.

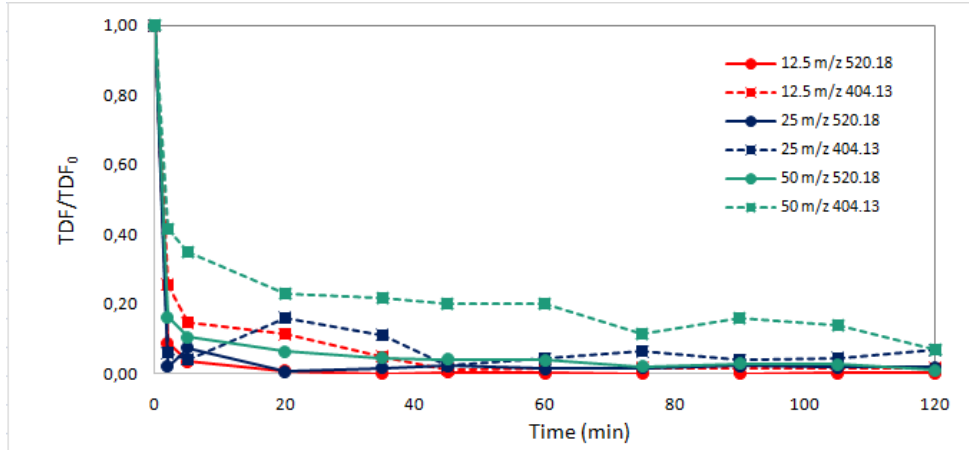
At 50 mgL<sup>-1</sup> there was a reduction in the degradation percentage compared with those at lower concentrations. However, this preliminary result can be optimized by altering the relationship between the number of cells and the drug concentration and culture conditions.

Although the clearance time of the drug can be considered long, the resistance of *M. novacekii* to the relatively high TDF concentrations ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ), without impairment of growth, and the reduced formation of other products are important factors to be considered for the treatment of tenofovir disoproxil residues, even though complete degradation of the drug was not achieved. It should be highlighted that the active monoester was not completely removed and, as this is a worry some aspect that should be considered.

The sustainability and ease of use of the technique and the resistance of *M. novacekii* to xenobiotics are advantages of the method, but the extended period taken to achieve degradation may be a limiting factor, especially in the pharmaceutical industry.

### **Degradation of TDF via oxidation with Fenton's reagent**

To appraise the oxidative TDF degradation using Fenton's reagent, parameters were optimized in previous studies on drug degradation.<sup>58,46,47,80</sup> The fractioned addition of peroxide was previously calculated in order to optimize the degradation and consumption of hydrogen peroxide. The determination of TOC allowed the mensuration of the organic charge reduction and the HPLC/MS analysis enabled an evaluation of the presence of tenofovir disoproxil, of monoester and of other possible byproducts in the intermediate fractions during the tests. In the oxidation process, the maximum degradation of tenofovir disoproxil present in aqueous solution occurred within 35 minutes of the reaction start time for the concentrations  $12.5 \text{ mgL}^{-1}$  and  $25.0 \text{ mgL}^{-1}$ , while for the concentration of  $50.0 \text{ mgL}^{-1}$ , the time extended to 120 minutes (Fig. 5). Intense degradation occurred in the first minutes of the reaction for all tested concentrations. The reduction in the peak area at  $m/z$  520.18 occurred in a period of 2 minutes for the all concentrations, reaching a 98.0% reduction in the concentration of  $25 \text{ mgL}^{-1}$ . This rapid initial degradation was also observed by Elmolla and Chaudhuri,<sup>81</sup> who evaluated the degradation of the beta-lactam antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by Fenton's reagent, obtaining maximum degradation of the drugs within the first two minutes of the reaction. This rapid decomposition of pollutants is attributed to the immediate production of hydroxyl radicals.<sup>46</sup>



**Fig. 3.5** Relative intensity of the peak areas at  $m/z$  520.18 and  $m/z$  404.13 in chromatograms of the AOP aliquots at initial concentrations of 12.5, 25.0 and 50.0  $\text{mgL}^{-1}$

Examining the results obtained in the HPLC (Fig. 6) and TOC analyses of the degradation tests with Fenton's reagent, degradation of both tenofovir disoproxil ( $m/z$  520.18) and its monoester ( $m/z$  404.13) was observed. However, the TOC remained above 80% for the TDF concentrations of 50.0  $\text{mgL}^{-1}$ , at 55% for 12.5  $\text{mgL}^{-1}$  and reached 20% for 25.0  $\text{mgL}^{-1}$ , indicating that TDF mineralization was not achieved.

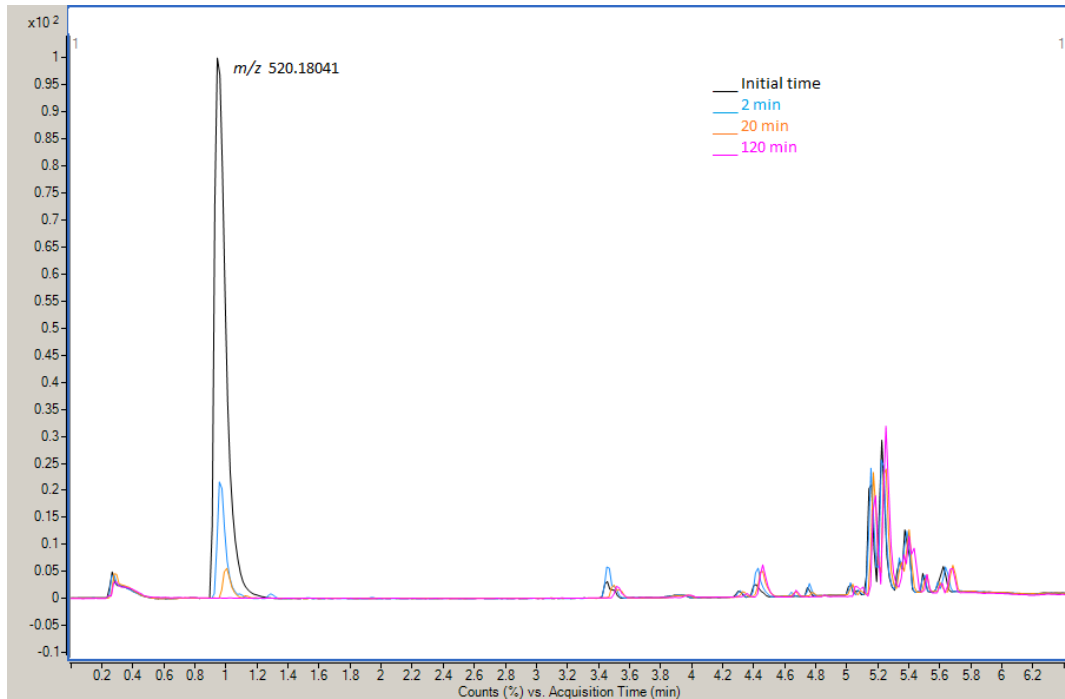
Many studies have demonstrated the efficiency of Fenton's reagent process in degradation of several other drugs, achieving significant removal of the initial active substance, despite a partial reduction of TOC. Velásquez *et. al.*<sup>82</sup> obtained a sulfathiazole removal rate of 84% after 8 minutes of reaction time with Fenton's reagent, in which only 30% of TOC removal was achieved after 60 min of reaction. Giri and Golder<sup>83</sup> reported 94% dipyrone removal after 45 minutes of reaction time and TOC removal of 28.4% and 42.7%, obtained, respectively, in 2.5 and 5 min.

Degradation of the tenofovir disoproxil ( $m/z$  520.18) and the monoester ( $m/z$  404.13) was monitored (Fig.6), the last because this compound was detected as the main TDF degradation product. Intense degradation was observed occurring in the first minutes of the reaction, significantly reducing the peak area at  $m/z$  404.13. After 2 minutes the reduction for the concentrations of 12.5  $\text{mgL}^{-1}$ , 25.0  $\text{mgL}^{-1}$  and 50.0  $\text{mgL}^{-1}$  was 74.5, 94.1 and 58.3%, respectively. Similar to biodegradation, Fenton's reagent was efficient in terms of the degradation of the drug but did not lead to total mineralization, as shown by the partial removal of TOC and the presence of other degradation products. However, this result should be further investigated by varying



the reaction conditions using Fenton's reagent to determine if total degradation of the drug can be achieved at different concentrations.

The TOC analysis showed a reduction of between 20 and 80%, which is in agreement with the HPLC/MS results. However, the percentage of TOC removal indicates the presence of degradation by-products.



**Fig. 3.6** Removal of tenofovir disoproxil and tenofovir monoester during Fenton degradation processing sample of  $50 \text{ mgL}^{-1}$

Various attempts were made to achieve total degradation of the drug; however, under the conditions tested, there were no improvements in the results. This confirms the great challenges posed by the treatment of tenofovir disoproxil residues in aqueous medium as the different oxidative conditions applied did not result in total degradation of the products in solution.

Although, total degradation of pollutants is not always possible. In most cases, only disruption of the molecular integrity can be achieved, potentially leading to loss of the biological activity of the molecule, which is then treated, using traditional treatment methods, as the total organic load of the effluent. However, some substances can generate toxic products and this aspect must be analyzed. In the case of TDF, in a very fast process, the intact drug molecule and the monoester, which are biologically active substances, were consumed, and tenofovir was not

identified among the reaction products. These aspects should be emphasized as advantages of the oxidation process of this drug with Fenton's reagent.

The oxidation process using Fenton's reagent has the generation of by-products that require treatment and final disposal as a limitation, in addition to a higher cost compared with the biodegradation process due to the reagents used. However, the speed and efficiency of the oxidation process with Fenton's reagent is extremely important in terms of industrial routine.

## **Conclusion**

The present study demonstrated the efficiency of biodegradation processes of tenofovir disoproxil using the cyanobacterium *Microcystis novacekii* and the fast degradation by advanced oxidation process using Fenton's reagent.

Results indicate that tenofovir monoester is formed as an intermediate product during both biodegradation and oxidation processes. Neither of the methods achieved complete removal of the drug and their metabolites, which demonstrates the difficulty in treating of the TDF residues. However, the results obtained are promising since they demonstrated effective removal of TDF using the treatment alternatives tested. Further studies on the degradation products generated are required.

Notably, there is a need to invest in research efforts to determine the best treatment conditions for residues of the antivirals, due to the likelihood of an increased demand for these drugs will likely grow in the coming years.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. A. R. Mahmood, H. H. Al-Haideri, F. M. Hassan, Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, *Iraq Advances in Public Health*, 2019, 1–10
2. N. Hanna, P. Sun, Q. Sun, X. Li, X. Yang, X. Ji, H. Zou, J. Ottoson, L. E. Nilsson, B. Berglund, O. J. Dyar, A. J. Tamhankar, C. S. Lundborg, Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk, *Environ. Int.* 2018, **114**, 131-142
3. T. P. Wood, C. S. J. Duvenage, E. Rohwer, The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water, *Environ. Pollut.*, 2015, **99**, 235-243
4. S. González, R. López-Roldán, J. L. Cortina, Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environ Pollut*, 2012, **161**, 83-92
5. H. Yamamoto, Y. Nakamura, C. Kitani, T. Imari, J. Sekizawa, Y. Takao, N. Yamashita, N. Hirai, S. Oda, N. Tatarazako, Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan 2007, *Environ. Sci*, **14**, 177-93
6. K. Fent, A. Weston, D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.*, 2006, **76**, 122-159
7. M. Hernando, M. Mezcua, A. Fernandez-Alba, D. Barcelo, (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments, *Talanta*, 2006, **69**, 334-342
8. K. Kümmerer, Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic AIDS and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review, *Chemosphere*, 2001, **45**, 957-969
9. P. Rzymiski, A. Drewek, P. Klimaszyk, Pharmaceutical pollution of aquatic environment: an emerging and enormous challenge, *Limnol. Review.*, 2017, **17**, 97-107
10. F. O. Agunbiade, B. Moodley, Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2016, **35** 36-46
11. E. Fabbri, Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2015, **1340**, 20-28
12. J. Fick, R. H. Lindberg, M. Tysklind, D. G. J. Larsson, Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals, *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010, **58**, 516-523

13. M. Isidori, A. Nardelli, L. Pascarella, M. Rubino, A. Parrella, Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms, *Environ. Int.*, 2007, **33**, 635-641
14. J. Fick, H. Söderström, R. H. Lindberg, C. Phan, M. Tysklind, D. G. J. Larsson, Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2009, **28**, 2522-2527
15. A. A. Godoy, F. Kummrow, P. A. Z. Pamplin, Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment- A review, *Chemosphere*, 2015, **138**, 281-291
16. M. I. Badawy, R. A. Wahaab, A. S. El-Kalliny, Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater, *J. Hazard. Mater.*, 2009, **167**, 567-574
17. S. Ncube, L. M. Madikizel, L. Chimuka, M. M. Nindi, Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives, *Water Res*, 2018, **145**, 231-247
18. S. Daouk, N. Chèvre, N. Vernaz, P. Bonnabry, P. Dayer, Y. Daali, S. Fleury-Souverain, Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents, *J. Environ. Manage.*, 2015, **160**, 324-332
19. Y. Luo, W. Guo, H. H. Ngo, L. D. Nghiem, F. I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X. C. Wang, A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Sci Total Environ*, 2014, **473**, 619-641,
20. K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *J. Environ. Manage.*, 2009, **90**, 2354-2366
21. J. Gregson, M. Tang, N. Ndembi, R. L. Hamers, S. Y. Rhee, V. C. Marconi, T. Rinke de Wit, Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study, 2016, *Lancet Infect. Dis.*, **16**, 565–575
22. UNAIDS. World AIDS Day 2014 Report - fact sheet. 2014 <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/World-AIDS-DayReport-2014/factsheet> (accessed jun. 2019).
23. S. Fekadu, E. Alemayehu, R. Dewil, B. Van der Bruggen, Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge, *Science of the Total Environment*, 2019. **654**, 324-337.
24. P. Bottoni, and S. Caroli, Presence of residues and metabolites of pharmaceuticals in environmental compartments, food commodities and workplaces: A review spanning the three-year period 2014–2016. *Microchemical Journal*, 2018, **136**, 2-24.

25. K. O. K'oreje, K. Demeestere, P. De Wispelaere, L. Vergeynst, J. Dewulf, H. Van Langenhove, From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. *Sci Total Environ*, 2012, **1437**, 153-64
26. K. O. K'oreje, L. Vergeynst, D. Ombaka, P. De Wispelaere, M. Okoth, H. Van Langenhove, K. Demeestere, Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya, *Chemosphere*, 2016, **149**, 238-44
27. C. Prasse, M. P. Schlüsener, R. Schulz, T. A. Ternes, Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance? *Environ. Sci. Technol.* 2010, **44**, 1728-35
28. Y. Aminot, X. Litrico, M. Chambolle, C. Arnaud, P. Pardon, H. Budzinski, Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 2015, **407**, 8585-8604
29. S. Geboers, S. Haenen, R. Mols, J. Brouwers, J. Tack, P. Annaert, P. Augustijns, Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans, *Int. J. Pharm.*, 2015, **15**, 131-7
30. D. M. Moss, P. Domanico, M. Watkins, S. Park, R. Randolph, S. Wring, R. K. R. Rajoli, J. Hobson, S. Rannard, M. Siccardi, A. Owen, Simulating intestinal transporter and enzyme activity in a physiologically based pharmacokinetic model for tenofovir disoproxil fumarate, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, **61**, e00105-17
31. R. A. Murphy, M. A. Valentovic, Factors Contributing to the Antiviral Effectiveness of Tenofovir, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2017, **363**, 156-163,
32. B. P. Kearney, J. F. Flaherty, J. Shah, Tenofovir Disoproxil Fumarate, *Clin. Pharmacokinet*, 2004, **43**, 595-612
33. S. N. Tolboom, D. Carrillo-Nieves, M. de Jesús Rostro-Alanis, R. de la Cruz Quiroz, D. Barceló, H. M. N. Iqbal, R. Parra-Saldivar, Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment – A review, *Sci Total Environ*, 2019, **665**, 358–366
34. Y. Wang, S. H. Ho, C. L. Cheng, W. Q. Guo, D. Nagarajan, N. Q. Ren, D. J. Lee, J. S. Chang, Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment, *Bioresour Technol*, 2016, **222**, 485-497
35. S. Abinandanand, S. Shanthakumar, Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: Renew, *Sust. Energ. Rev.*, 2015, **52**, 123-132

36. K. B. Chekroun, E. Sánchez, M. Baghour, The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *Journal Issues*, 2014 ISSN 2360: 8803.
37. Y. Wu, T. Li, L. Yang, Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review. *Bioresour Technol.*, 2012, **107**, 10-18
38. M. Xiao, M. Li, C. S. Reynolds, Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*, *Biol. Rev.*, **93**, 1399-1420
39. E. A. El-Bestawy, A. Z. A. El-Salam, A. E. R. H. Mansy, Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents, *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, 2007, **59**, 180-192
40. Bicudo C. E., Menezes M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. Rima, Brazil,(2006).
41. M. M. C. Campos, V. H. F. Faria, T. S. Teodoro, F. A. R. Barbosa, S. M. S. Magalhães, Evaluation of the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* to remove atrazine from a culture medium, *J. Environ. Sci. Health.*, 2013, **48**,101-107
42. I. A. Fioravante, B. Albergaria, T. S. Teodoro, S. M. S. Magalhães, F. Barbosa, R. Augusti, Removal of  $17\alpha$ -ethinylestradiol from a sterile WC medium by the cyanobacteria *Microcystis novacekii*, 2012, *J. Environ. Monit.* **14**, 2362-2366
43. R. S. Rana, P. Singh, V. Kandari, R. Singh, R. Dobhal, S. Gupta, A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries wastewater: an Indian perspective, *Appl. Water. Sci.*, 2014, **7**, 1-12
44. A. Langenhoff, N. Inderfurth, T. Veuskens, G. Schraa, M. Blokland, K. Kujawa-Roeleveld, H. Rijnaarts, Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater, *BioMed. Res. Int.* 2013,1-9
45. N. Gaur, K. Narasimhulu, Y. PydiSetty, Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment, *J. Clean. Prod.*, 2018, **198**, 1602-1631
46. A. Babuponnusami, K. Muthukumar, A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment, *J. Environ. Chem. Eng* , 2014, **2**, 557-572
47. F. Ay, F. Kargi, Advanced oxidation of amoxicillin by Fenton's reagent treatment, *J. Hazard. Mater.* 2010,**179**,1-3
48. A. Mirzaei, Z. Chen, F. Haghghat, L. Yerushalmi, Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogenous Fenton-type processes – A review, *Chemosphere*, 2017,**174**, 665–688

49. N. Azbar, T. Yonar, K.Kestioglu, Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent, *Chemosphere*, 2004, **55**, 35-43
50. Ollerl, S. Malato, J. A. Sánchez-Pérez, Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination - A review, 2011, *Sci. Total Environ.*, **409**, 4141-4166
51. S. Matavos-Aramyan and M. Moussavi, Advances in Fenton and Fenton based oxidation processes for industrial effluent contaminants control - a review, *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour.*, 2017, **2**, 1-18
52. M. Zhang, H. Dong, L. Zhao, D. Wang, D. Meng, A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective, *Sci. Total Environ.*, 2019, **670**, 110–121
53. A. Sharma, J. Ahmad, S. J. S. Flora, Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products, *Environ. Res.* 2018, **167**, 223–233
54. A. D. Bokare and W. Choi, Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes, *J. Hazard. Mater.*, 2014, **275**,121-135
55. A. P. Christoff, A. F. R. Sereia, D. R. Boberg, R. L. Moraes, L. F.V. Oliveira, Bacterial identification through accurate library preparation and high-through put sequencing. WhitePaper: Bacterial NGS Sequencing
56. P. Gorham, J. McLachlan, U. T. Hammer, W. K. Kim, Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb, *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*,1964, **15**, 796-804
57. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Principles and strategies related to the testing of degradation of organic chemicals. Part 1. July 2003.
58. J. F. Perez, J. Llanos, C. Saez, C. Lopez, P. Canizares, M. A. Rodrigo, Treatment of real effluents from the pharmaceutical industry: A comparison between Fenton oxidation and conductive-diamond electro-oxidation, *J. Environ. Manage.*, 2017, **195**, 216-223
59. W. G. Moravia, L. C. Lange, M. C. S. Amaral, Evaluate of advanced oxidative process by Fenton reagent under optimized conditions for landfill leachate treatment of with emphasis on collective parameters and characterization of sludge generated, *Quim. Nova*, 2011, **34**,1370-1377
60. R. F. P. Nogueira, A. G. Trovó, M. R. A. Silva, R. D. Villa, M. C. Oliveira, Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. *Quim. Nova*, 2007, **30**, 400-408

61. A. G. Trovó, R. F. P. Nogueira, A. Agüera, A. R. Fernandez-Alba, S. Malato, Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process—chemical and toxicological assessment, *Water research.*, 2011, **45**, 1394-1402
62. M. C. Oliveira, R. F. P. Nogueira, J. A. Gomes Neto, W. F. Jardim, J. J. Rohwedder, Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio em processo de fotodegradação por reação foto-Fenton, *Quím. Nova*, 2001, **24**, 188-190
63. M. Kurmi, V. M. Golla, S. Kumar, A. Sahu, S. Singh, Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 1: characterization of tenofovir disoproxil fumarate degradation products by mass spectrometry, *RSC Advances*, 2015, **5**, 96117–96129
64. The United States Pharmacopeia, [http://www.usp.org/sites/default/files/usppdf/EN/USendingStandards/m3429\\_authorized.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usppdf/EN/USendingStandards/m3429_authorized.pdf), (accessed July 2019).
65. Tenofovir disoproxil fumarate, The International Pharmacopoeia, World Health Organization, Geneva, 2015.
66. L. Yuan, T. C. Dahl, R. Oliyai, Degradation Kinetics of Oxycarbonyloxymethyl Prodrugs of Phosphonates in Solution, *Pharm. Res.*, 2001, **18**, 234–237
67. J. P. A. SILVA, Estudo de estabilidade do antirretroviral tenofovir: uma abordagem integrada para o desenvolvimento de medicamento. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
68. X. Zhang, L. Liu, S. Zhang, Y. Pan, J. Li, H. Pan, S. Xu, F. Luo, Biodegradation of Dimethyl Phthalate by Freshwater Unicellular Cyanobacteria, *Biomed. Res. Int.* 2016, 1–8.
69. L. Ferrer-Parra, D. I. López-Nicolás, R. Martínez-Castillo, J. P. Montiel-Cina, A. R. Morales-Hernández, E. Ocaña-Romo, A. G. Márquez, M. Portillo-Ojeda, D. F. Sánchez-Sánchez, C. Sánchez, Partial characterization of esterases from *Fusarium culmorum* grown in media supplemented with di (2-ethyl hexyl phthalate) in solid-state and submerged fermentation, *Mex. J. Biotechnol.* 2018, **3**, 82-94
70. K. M. Donald, D. J. Scanlan, N. G. Carr, N. H. Mann, I. Joint, Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, *J. Plankton. Res.*, 1997, **19**, 1793–1813
71. R. Ramanan, B. H. Kim, D. H. Cho, H. M. Oh, H. S. Kim, Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Biotechnol. Adv.*, 2016, **34**, 14-29
72. M. M. Pacheco, M. Hoeltz, M. S. Moraes, R. C. S. Schneider, Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation, *J. Environ. Sci. Health.*, 2015, **50**, 585-601



73. J. Van Gelder, Intestinal Absorption Enhancement of the Ester Prodrug Tenofovir Disoproxil Fumarate through Modulation of the Biochemical Barrier by Defined Ester Mixtures, *Drug Metabolism. and Disposition.*, 2002, **30**, 924–930
74. B. Huang, J. Tang, H. He, L. Gu, X. Pan, Ecotoxicological effects and removal of 17  $\beta$ -estradiol in chlorella algae, 2019, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **15**, 377-383
75. S. Zhang, C. B. Qiu, Y. Zhou, Z. P. Jin, H. Yang, Bioaccumulation and degradation of pesticide fluroxypyr are associated with toxic tolerance in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ecotoxicology*, 2011, **20**, 337-347
76. A. E. Kirkwood, C. Nalewajko, R. R. Fulthorpe, The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants, *Microb. Ecol.*, 2006, **51**, 4-12
77. R. De Philippis and M. Vincenzini, Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1998, **22**, 151-175
78. k. M. Brooks, M. E. Ibrahim, J. R. Castillo-Mancilla, S. MaWhinney, K. Alexander, S. Tilden, B. J. Kerr, L. Ellison, C. McHugh, L. R. Bushman, J. J. Kiser, S. Hosek, G. D. Huhn, P. L. Anderson, Pharmacokinetics of tenofovir monoester and association with intracellular tenofovir diphosphate following single-dose tenofovir disoproxil fumarate, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, **74**, 2352-2359
79. B. Źyszka-Haberecht, E. Niemczyk, J. Lipok, Metabolic relation of cyanobacteria to aromatic compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, **103**, 1167-1178
80. V. Homem, A. Alves, L. Santos, Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments, *Sci. Total Environ.*, **408**, 6272-6280
81. E. S. Elmolla and M. Chaudhuri, Degradation of the antibiotics amoxicillin, ampicillin and cloxacillin in aqueous solution by the photo-Fenton process, *J. Hazard. Mater.*, 2009, **172**, 1476-1481
82. M. Velasquez, I. P. Santander, D. R. Contreras, J. Yanez, C. Zaror, R. A. Salazar, M. Perez-Moya, H. D. Mansilla, Oxidative degradation of sulfathiazole by Fenton and photo-Fenton reactions, *J. Environ. Sci. Health.* **49**, 661-670
83. A. S. Giri and A. K. Golder, Fenton, photo-fenton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photolysis, and TiO<sub>2</sub> photocatalysis for dipyrone oxidation: drug removal, mineralization, biodegradability, and degradation mechanism, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2014, **53**, 1351-1358

## CAPÍTULO 4

### **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do antirretroviral fumarato de tenofovir disoproxil usando o modelo *Allium cepa*.**

Silva S R<sup>1</sup>, Antunes N L<sup>1</sup>, Fernandes T C C<sup>2</sup>, Oliveira R P B<sup>3</sup>, Mol M P G<sup>4</sup>,  
Magalhães S M S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmácia Social, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biomédicas, Faculdade de Americana, Americana, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup>Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento. Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

#### **Resumo**

O fumarato de tenofovir disoproxil (TDF) é um fármaco antirretroviral, análogo de nucleotídeo que atua por inibição da enzima transcriptase reversa viral. Embora o fármaco seja amplamente utilizado no tratamento da infecção por HIV, informações acerca do impacto de seus resíduos no ambiente são muito limitadas. O teste do *Allium cepa* pode oferecer importantes informações sobre o potencial citogenotóxico e mutagênico desse fármaco no meio ambiente. Neste estudo, utilizou-se o teste do *Allium cepa* para avaliar a citotogenotoxicidade do TDF, por meio da exposição de sementes de *A. cepa* a concentrações do fármaco que variavam de 0.27 mg.L<sup>-1</sup> a 2800 mg.L<sup>-1</sup> por 120h. Foram determinados o índice de germinação para avaliação de toxicidade, os índices mitótico para a avaliação de citotoxicidade, de aberrações cromossômicas para avaliação genotóxica e de micronúcleos como parâmetro de avaliação mutagênica. Os resultados demonstraram que a germinação das sementes não foi afetada na presença de TDF nas concentrações testadas. O TDF em concentrações de até 265mg.L<sup>-1</sup> mostrou discreto aumento do índice mitótico; já em concentrações superiores a 300.00 mg.L<sup>-1</sup> houve significativa redução desse

índice com inibição da proliferação celular. A aderência foi a aberração cromossômica mais significativa verificada no ensaio. Observou-se expressiva formação de micronúcleos, tanto nas células meristemáticas quanto na região F1 das radículas, indicando efeitos genotóxicos e mutagênicos em concentrações próximas a concentrações plasmáticas em humanos. Embora as concentrações do TDF que apresentaram efeitos citogenotóxicos possam ser consideradas muito altas em relação aos níveis ambientais, o extensivo uso do TDF, especialmente em regiões pobres e com estrutura sanitária precária, sugere cautela quanto ao lançamento de efluentes contendo resíduos desse fármaco em águas superficiais, devido a seu potencial dano à replicação celular.

**Palavras chave:** Fármacos, antirretroviral, contaminantes emergentes, genotoxicidade, aberrações cromossômicas, mutagenicidade

## INTRODUÇÃO

A síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), doença causada pela infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foi identificada na década de 1980 e se tornou epidêmica em alguns países com alta morbidade e mortalidade (Vega e Espinoza, 2018; Yoshimura, 2017). A mobilização do meio científico para o desenvolvimento de fármacos efetivos no controle da infecção levou à introdução de vários antiretrovirais – ARVs, fazendo com que a infecção pelo HIV, assumisse características de uma doença crônica, permitindo, assim, que pessoas que vivem com HIV retomassem a qualidade e expectativa de vida (Cohen *et al.*, 2008; Teeraananchai *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2015).

O fumarato de tenofovir desoproxil (TDF) é um fármaco antirretroviral, análogo ao nucleotídeo adenosina 5' monofosfato que atua por inibição da enzima transcriptase reversa (TR), interrompendo a replicação do vírus HIV. Esse fármaco foi introduzido na terapia da infecção pelo HIV há menos de 20 anos e é considerado um medicamento de primeira linha no controle da infecção (Moraes Filho *et al.*, 2017; Brooks *et al.*, 2019). Em geral, as pessoas que vivem com HIV/AIDS, uma vez diagnosticados, utilizam esse medicamento, associado a outros ARVs de forma contínua ao longo de toda vida, a fim de que ocorra a supressão da multiplicação viral (Cooper *et al.*, 2010; Holec *et al.*, 2018).

De acordo com Ncube *et al.* (2018), considerando a utilização diária de TDF no mundo, cerca de 5,49 toneladas desse fármaco são liberadas no ambiente a cada dia, resultando em uma média global estimada de 2,35 ngL<sup>-1</sup> em águas superficiais. Porém, sabe-se que essas concentrações residuais não são uniformes, sendo determinadas por questões demográficas, número de usuários do fármaco e condições sanitárias, como a presença do tratamento de esgotos, variando amplamente entre os diferentes locais. Assim, Wood *et al.* (2015) relataram concentrações de 145–243 ngL<sup>-1</sup> de tenofovir em rios da África do Sul.

A falta de informações acerca dos diversos aspectos da toxicidade ambiental do TDF traz preocupação quanto a possíveis efeitos deletérios sobre os organismos aquáticos. O potencial mutagênico de fármacos em efluentes tem se mostrado de grande importância no espectro de efeitos tóxicos ambientais (Yilmaz *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2009)

Para a pesquisa de efeitos tóxicos de contaminantes ambientais, bioensaios utilizando espécies vegetais como *Allium cepa*, podem ser ferramentas úteis e complementares para determinação da citogenotoxicidade e mutagenicidade (Hara *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2015; Herrero *et al.*, 2012). O teste com *A. cepa* permite a observação de efeitos sobre a germinação, efeitos citotóxicos e genotóxicos que se manifestam por alterações nas células germinativas, na região meristemática das radículas emergentes e por efeitos mutagênicos, que se perpetuam ou inviabilizam o desenvolvimento vegetal (Leme e Marin-Morales, 2009). O teste do *A. cepa* constitui, assim, um modelo preditivo de genotoxicidade de poluentes.

Embora o teste do *A. cepa* não seja previsto nos protocolos de análise ecotoxicológica, esse modelo tem sido utilizado na avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de fármacos. Oliveira *et al.* (2017) avaliaram a genotoxicidade de três glicocorticóides (prednisolona, dexametasona e hidrocortisona) em soluções aquosas, e observaram aumento significativo no índice de aberrações cromossômicas, indicando potencial genotóxico desses fármacos nas concentrações testadas. Mišík *et al.* (2014) e Stephen *et al.* (1980) pesquisaram as propriedades genotóxicas de medicamentos antineoplásicos utilizando ensaios de micronúcleos com o modelo *A. cepa*. Os pesquisadores concluíram que essa classe de medicamentos pode estender seus efeitos tóxicos a outros organismos. O potencial genotóxico do ansiolítico Alprazolam (Musanovic *et al.* 2013) e atividade clastogênica do anti-hipertensivo metildopa (Grisolia e Takahashi 1991) foram também demonstrados usando o teste *A. cepa*, os dois estudos indicaram que esses fármacos, quando lançados no ambiente, podem levar a danos ao patrimônio genético de outras espécies. Onwuamah *et al.* (2014) e Abdel-Azeem *et al.* (2014) investigaram o potencial do ensaio *A. cepa* para demonstrar a citogenotoxicidade dos ARVs zidovudina e nevirapina e de derivados de sulfadiazina. Estes estudos permitiram verificar a ocorrência de alterações no índice mitótico e a indução de aberrações cromossômicas pelos fármacos. Deste modo verifica-se a potencialidade do teste do *A. cepa* no estudo citogenotóxico de fármacos.

O teste com *A. cepa* mostra-se sensível e aplicável à pesquisa de efeitos genotóxicos e mutagênicos em diversas matrizes ambientais (Iqbal *et al.*, 2019). A transposição dos dados obtidos por meio desse teste para a espécie humana não é

um consenso, porém Leme e Marin-Morales (2009), relatam que os resultados correlacionam-se com os dados de genotoxicidade obtidos em sistemas procarióticos e eucarióticos e são potencialmente extrapoláveis para humanos. Destaca-se que Fiskejo (1985) demonstrou correlação de 82% dos resultados obtidos com o teste de *A. cepa* com ensaios de carcinogenicidade em roedores.

Quando comparado a outros bioensaios de genotoxicidade, o teste utilizando *A. cepa* apresenta uma série de vantagens, dentre as quais o baixo custo, sensibilidade, rapidez de execução, facilidade de cultivo da espécie em laboratório, disponibilidade das sementes durante todo o ano e a possibilidade de ser usado tanto em testes de toxicidade aguda quanto crônica, em condições laboratoriais e em campo (Fiskejo, 1985; Herrero *et al.*, 2012).

Alguns aspectos do mecanismo de ação do TDF sugerem que esse fármaco possa apresentar efeitos sobre a replicação celular e danos ao material genético de espécies não alvo, o que motivou este estudo. O TDF, por ser estruturalmente similar ao substrato natural da enzima transcriptase reversa (TR), compete com esse nucleotídeo pela ligação à enzima. Ao ligar-se à TR, o fármaco inibe irreversivelmente a TR, levando ao término da cadeia de DNA viral (Brooks *et al.*, 2019). Em geral, nas diferentes espécies, existem enzimas funcionalmente semelhantes que atuam na replicação do DNA. Assim, apesar da seletividade da TR, o TDF pode potencialmente interagir com outras enzimas diretamente relacionadas com síntese de DNA em diferentes sistemas biológicos, podendo alterar o processo de replicação celular.

Considerando o amplo uso do antirretroviral TDF, o risco de contaminação de águas superficiais por resíduos desse fármaco e seus possíveis efeitos sobre organismos não-alvo, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do TDF utilizando a espécie *Allium cepa* como sistema teste.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Reagentes**

O fumarato de tenofovir desoproxil foi obtido da Nortec Química (lote 507034), como um sólido branco e amorfo. O fármaco foi analisado e certificado pelo controle

de qualidade da Fundação Ezequiel Dias - MG (FUNED). Os reagentes, solventes e outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico e todas as soluções utilizadas foram preparadas usando água purificada tipo 1.

### **Organismo teste**

As sementes de *A. cepa* baia periforme, marca Isla Pak lote 42011 – 52 foram adquiridas no comércio varejista de sementes no Mercado Central de Belo Horizonte. Em todos os testes, foram utilizadas sementes da mesma marca e lote.

### **Preparo das soluções teste**

As soluções teste foram preparadas a partir de uma solução estoque de TDF 3000.00 mg.L<sup>-1</sup>. Para os ensaios, foram utilizadas duas séries de concentração, denominadas: Série 1 e Série 2. Para a Série 1, utilizou-se como referência a concentração plasmática média do TDF em pessoas vivendo com HIV que utilizam 300 mg de TDF por dia, a qual segundo Teixeira (2011), é de cerca de 0.27 mg.L<sup>-1</sup> e concentrações 100 e 1000 vezes maiores (0.27, 26.50 e 265.00 mg.L<sup>-1</sup>), considerando uma possível acumulação ambiental.

Uma segunda série de concentrações (300.00, 800.00, 2100.00 e 2800.00 mg.L<sup>-1</sup>) foi definida a partir da concentração onde observou-se redução de 50% do crescimento das radículas (2800mg.L<sup>-1</sup>), indicando possível efeito citotóxico. Como controle negativo (CN), foi utilizada água purificada.

### **Avaliação de toxicidade do TDF para *A. cepa***

Na avaliação de toxicidade, foram realizadas análises do índice de germinação (IG). Em placas de Petri, forradas com papel de filtro, foram distribuídas 25 sementes de *A. cepa*, sendo quatro placas para cada concentração testada. Às placas foram adicionados 2,0 ml da solução de TDF de cada uma das diluições referentes às concentrações testadas. As placas foram transferidas para incubadora e mantidas a 23°C por 120 horas, no escuro. O IG foi calculado conforme equação 1.

$$IG = \left( \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de sementes germinadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de sementes analisadas}} \right) \times 100 \quad (1)$$

### **Avaliação citotóxica, genotóxicas e mutagênicas sobre as sementes de *Allium* cepa expostas ao TDF**

Após 120 h de incubação a 23°C no escuro, todas as sementes germinadas foram transferidas para frascos de vidro contendo 10 ml de solução de Carnoy 3:1 e mantidas nessa solução para fixação durante 6 horas. Em seguida, foram selecionadas aleatoriamente 10 radículas, as quais foram transferidas para frascos de vidro contendo ácido clorídrico (HCl) 1M em temperatura de 60°C, onde permaneceram por 11 minutos para a hidrólise ácida. Após a hidrólise, as radículas foram lavadas com água purificada (Fiskesjö, 1985) e submetidas a coloração pelo método de Feulgen. As radículas foram transferidas para frascos de vidro contendo 10 ml do reagente de Schiff e mantidas nessa solução por duas horas, em ambiente protegido de luz. Foram confeccionadas lâminas a partir de cortes histológicos da região meristemática e da região imediatamente acima, denominada região F1. As regiões foram seccionadas sobre lâminas de vidro e adicionada de uma gota de solução de carmim acético (1%). As lâminas foram recobertas com lamínula e delicadamente prensadas. Após secagem, as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido para retirada das lamínulas, adicionadas de uma gota de resina (Entelan) e fixadas com novas lamínulas. As lâminas foram analisadas por microscopia ótica em objetiva de 100 vezes em óleo de imersão. Foram preparadas e analisadas 10 lâminas para cada concentração, avaliando-se 500 células por lâmina da região meristemática, totalizando 5000 células para cada concentração e para o controle negativo. Na região F1, foram analisadas 300 células por lâmina, totalizando de 3000 células (Leme e Marin-Morales, 2009). O Índice mitótico (IM) representa a razão entre o número de células em divisão e o total de células analisadas (Equação 2). O IM foi determinado para uma avaliação de possíveis efeitos do fármaco sobre as etapas da divisão celular.

$$IM = \left( \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células em divisão}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \right) \times 100 \quad (2)$$



Para determinar a genotoxicidade, as aberrações cromossômicas – AC (quebras, perdas, aderências e pontes cromossômicas) nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) foram contabilizadas estimando-se o índice de aberrações cromossômicas (IAC), (Equação 3).

$$IAC = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{de células com aberrações cromossômicas}}{\text{N}^\circ \text{total de células analisadas}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Para a avaliação mutagênica foi analisado o índice de micronúcleos (IMN) obtido tanto na região meristemática quanto na região F1 por contagem do número de micronúcleos formados em relação ao número total de células analisadas (Equação 4).

$$IMN = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{de células com MN}}{\text{N}^\circ \text{de células analisadas}} \right) \times 100 \quad (4)$$

### **Análises estatísticas**

Utilizou-se nas análises estatísticas o Teste do Qui-Quadrado para comparação de duas ou mais proporções (ou Teste Exato de Fisher, quando necessário), o qual permitiu comparar o índice de germinação, os índices mitótico, de aberrações cromossômicas e de micronúcleos para diferentes concentrações de TDF. Caso o teste resultasse na rejeição de hipótese nula, executaram-se comparações dois a dois entre as concentrações de TDF (aplicou-se a Correção de Bonferroni para as comparações múltiplas). Foi utilizado o pacote “stats” do software R, R Core Team (2019).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Teste de toxicidade**

As sementes de *A. cepa* utilizadas, nas condições padronizadas, apresentaram taxa de germinação natural, ou seja, na ausência do TDF, superiores a 80%.

Verificou-se que tanto na série 1 quanto na série 2, mesmo em concentrações superiores a 2000.00 mg.L<sup>-1</sup>, as taxas de germinação mantiveram-se acima de 70%, não apresentando diferença significativa no índice de germinação das sementes expostas ao TDF quando comparadas ao controle. Um agente pode ser considerado fitotóxico quando promove redução superior a 50% no índice de germinação de sementes de *A. cepa*, em relação ao controle (Fiskesjö, 1985). Neste estudo, sementes tratadas com altas concentrações de TDF não atingiram essa porcentagem de inibição da germinação, indicando que o TDF não exerce efeitos fitotóxicos nesse estágio do desenvolvimento vegetal.

O fato de não haver uma interferência significativa do TDF na germinação não significa que ele não possa causar alterações no material gênico, afetando outras etapas do desenvolvimento vegetal.

As sementes apresentam em sua estrutura uma camada protetora ou tegumento que protege o embrião de agentes externos e da perda de água. A germinação é o primeiro estágio do biociclo vegetal e caracteriza-se por uma sequência de eventos fisiometabólicos complexos, que se iniciam com a embebição de água e culminam no rompimento do tegumento, o que permite a emergência do eixo embrionário do interior da semente e a protrusão da radícula (Oliveira, 2019; Carvalho e Nakagawa, 2000). A semente fica, assim, exposta a possíveis agentes tóxicos que, eventualmente, podem causar danos que inviabilizem a germinação. Após a germinação, inicia-se uma fase de intensa atividade celular. As radículas emergentes apresentam morfologia consideravelmente diferente da semente e caracterizam-se pela alta taxa de replicação celular e mecanismos eficientes de captação de nutrientes. Assim, as radículas ficam expostas a diferentes fatores externos, inclusive a agentes químicos, que podem comprometer o alongamento ou inviabilizar seu crescimento (Pan e Chu, 2016; Araújo e Monteiro, 2005). As altas taxas de replicação celular, especialmente na região meristemática das radículas, fazem com que esse processo seja muito sensível a interferências de compostos tóxicos.

Nessa etapa, a atividade fitotóxica pode se manifestar por diferentes mecanismos, mediados pela capacidade de xenobióticos de penetração nas células e interação com alvos celulares com interferências diretas no processo de replicação, inibição enzimática de processos vitais ou efeitos sobre alvos celulares inespecíficos (Limmer e Burken, 2014; Pullagurala *et al.*, 2018; Marchi *et al.*, 2008).

Os resultados desse estudo indicam que O TDF em concentração próxima à concentração plasmática em humanos, não parece desencadear danos irreversíveis que inviabilizem o desenvolvimento da raiz.

### **Avaliação citotóxica e genotóxica do TDF**

A análise citotóxica e genotóxica das radículas do *A. cepa* expostas ao TDF foi realizada para as duas séries de concentrações. A citotoxicidade foi avaliada a partir de possíveis efeitos do fármaco sobre as etapas da divisão celular. Na série 1, não houve variação regular do índice mitótico em relação a dose de TDF. Na concentração de 0.27 mg.L<sup>-1</sup> foi observado um discreto aumento do IM em relação ao controle, invertendo-se esse índice a partir do segundo ponto da série (26.5 mg.L<sup>-1</sup>). Por ser uma série limitada a três pontos, os resultados devem ser analisados com cautela, pois sistemas biológicos podem apresentar uma considerável variabilidade própria do modelo. Porém, alguns fármacos podem apresentar efeitos estimuladores do crescimento em baixas concentrações, ao passo que em concentrações mais elevadas prevaleçam efeitos inibitórios. Esse é o caso do anti-hipertensivo metildopa. Grisolia e Takahashi, (1991), em estudo com esse fármaco, sugerem que, em altas concentrações, ocorra uma modificação dos efeitos tóxicos sobre o *A. cepa*, fazendo com que os modelos em altas e baixas concentrações tenham comportamentos diferentes e não possam ser comparados.

Variações no IM podem apontar efeitos inibitórios ou estimulantes da replicação celular. Valores de IM maiores que o controle negativo resultam de um aumento na divisão celular. Esse aumento isoladamente não pode ser interpretado como prejudicial ao desenvolvimento do organismo. Contudo, quando o aumento da IM está associado a aberrações cromossômicas, pode indicar aumento da proliferação associada à formação de tecido tumoral (Leme e Marin-Morales 2009; Lutterbeck, *et al.*, 2015).

Em relação à série 2, observou-se que os testes comparados ao controle mostraram diminuição expressiva e estatisticamente significativa em relação ao IM (Tab.4.1), chegando a redução de até 80% em relação ao controle na concentração de 2800 mg.L<sup>-1</sup>, sugerindo alterações resultantes da interação do TDF com múltiplos alvos celulares das radículas de *A. cepa*.

**Tabela 4.1 - Índice Mitótico em diferentes concentrações de TDF**

Concentração TDF (mg.L <sup>-1</sup> )	IM	95% IC	300.00	800.00	2100.00	2800.00
<b>Série 2</b>						
CN	0.1038	(0.0956;0.1126)	(0.0083;0.0409)	(0.0162;0.0482)	(0.0485;0.0777)	(0.0740;0.1006)
300.00	0.0792	(0.0720;0.0871)	-	(-0.0073;0.0226)	(0.0251;0.0520)	(0.0507;0.0747)
800.00	0.0716	(0.0647;0.0791)	-	-	(0.0178;0.0440)	(0.0435;0.0667)
2100.00	0.0407	(0.0355;0.0466)	-	-	-	(0.0147;0.0337)
2800.00	0.0165	(0.0133;0.0205)	-	-	-	-

Diferenças significativas evidenciadas em células acinzentadas. ( $\alpha = 0.0083 \Rightarrow \alpha_{global} = 0.05$ )

IM=Índice Mitótico; IC= Intervalo de confiança; CN= Controle negativo

Os resultados indicam que a redução do IM de células meristemáticas da raiz de *A. cepa* observada na série 2 é diretamente proporcional à concentração do fármaco.

Segundo Abdel Migid *et al.* (2007), um IM abaixo de 22% do IM do controle causa efeitos letais ao organismo teste (*A. cepa*), ao passo que um IM entre 22% e 50% geralmente indica efeitos subletais. Assim, o IM pode ser utilizado como indicador de citotoxicidade (Bianchi *et al.*, 2015; Kwasniewska *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2015). Na concentração de 2.100 mg observou-se que o IM foi cerca de 39% do IM do controle, enquanto que na maior concentração testada o IM alcançou a 16% do IM do controle.

Entre os efeitos genotóxicos, as aberrações cromossômicas (ACs) consistem de anomalias que podem se manifestar por alteração no número ou na estrutura dos cromossomos (Fernandes *et al.*, 2007), as quais podem ser decorrentes da inibição na síntese de metabólitos essenciais como as bases da cadeia de DNA ou alteração durante o processo de replicação de DNA, assim como quebras nas fitas de DNA, que podem ocorrer por exposição a poluentes (Albertini *et al.*, 2000). Dentre as ACs mais comuns, podem ser citadas as aderências, perdas, quebras e pontes cromossômicas (Iqbal *et al.*, 2019; Ngozi, 2011; Bianchi *et al.*, 2011).

As ACs em todas as concentrações da série 1 apresentam diferenças significativas (Tab. 4.2) em relação ao controle, enquanto na série 2 esses eventos foram esporádicos. Essa redução pode ser explicada porque em altas concentrações do fármaco pode ocorrer a inibição de vários processos metabólicos celulares que inviabilizam a replicação celular, não chegando a manifestarem-se as aberrações cromossômicas causadas pelo fármaco.

**Tabela 4.2 - Índice de Aberrações Cromossômicas em diferentes concentrações de TDF**

Concentração de TDF (mg.L <sup>-1</sup> )	IAC	95% IC	99.2% IC para diferença (Correção de Bonferroni)		
			0.27	26.50	265.00
CN	0.0012	(0.0005; 0.0027)	(-0.0086; -0.0018)	(-0.0071; -0.0008)	(-0.0108; -0.0032)
0.27	0.0064	(0.0044; 0.0091)	-	(-0.0030; 0.0054)	(-0.0065; 0.0029)
26.50	0.0054	(0.0032; 0.0077)	-	-	(-0.0075; 0.0014)
265.00	0.0082	(0.0060; 0.0112)	-	-	-

Diferenças significativas evidenciadas em células acinzentadas. ( $\alpha = 0.0083 \Rightarrow \alpha_{global} = 0.05$ )

IAC = Índice de Aberrações Cromossômicas; IC = Intervalo de confiança; CN = Controle negativo

A formação de quebras e pontes entre cromossomos foram raramente observadas. Verificou-se como principal AC causada pelo TDF a aderência cromossômica. .

Para a zidovudina, antirretroviral análogo de nucleosídeo, esse tipo de alteração foi também a mais observada no teste com *A. cepa* (Onwuamah *et al.*, 2014). Isso pode indicar que antivirais análogos de nucleosídeos e de nucleotídeos que atuam a nível cromossômico podem causar eventos semelhantes. Esse é um aspecto preocupante especialmente quando se considera que, os ARVs são utilizados em associação de acordo com os protocolos clínicos atuais, o que sugere que podem ocorrer efeitos aditivos sobre os processos de divisão celular.

Na tabela 4.3, são apresentadas as aberrações cromossômicas contabilizadas na análise da região meristemática nas concentrações de TDF avaliadas.

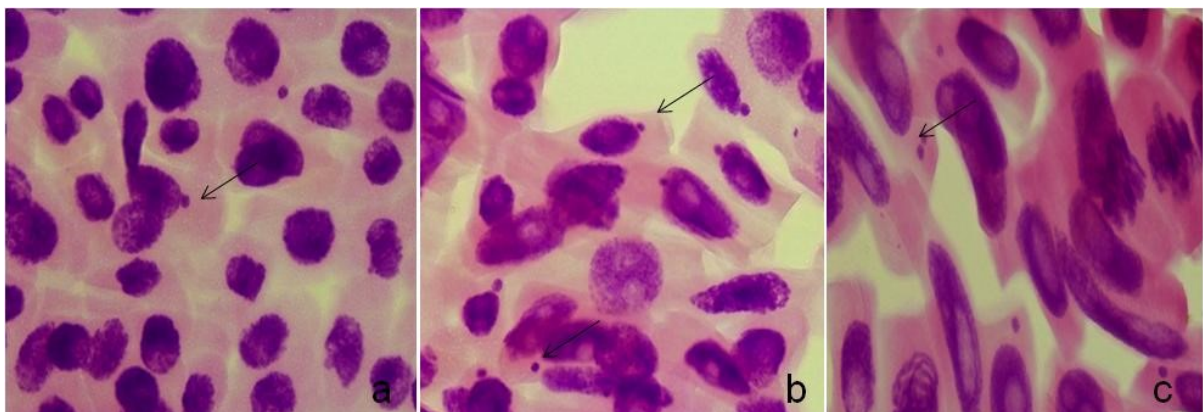
**Tabela 4.3 - Aberrações cromossômicas em células meristemáticas *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de TDF**

Concentração TDF mg.L <sup>-1</sup>	Quebras	Perdas	Aderências	Pontes
<b>Teste 1</b>				
Controle Negativo	0	0	6	0
0.27	2	0	29	1
26.50	0	0	26	0
265.00	4	0	37	0
<b>Teste 2</b>				
Controle Negativo	0	0	11	0
300.00	1	2	13	1
800.00	10	1	6	0
2100.00	4	2	2	0
2800.00	1	1	4	0

De acordo com Maluszynska e Juchimiuk (2005), as aberrações cromossômicas estruturais são consequência da quebra das fitas duplas do DNA que não foram reparadas ou foram reparadas incorretamente. Entres as ACs, as aderências se referem à tendência de braços cromossômicos ou cromossomos inteiros de se unirem. Admite-se que a aderência seja um efeito tóxico irreversível sobre a cromatina, que pode refletir o alto grau de toxicidade de substâncias químicas sobre o processo de replicação celular (Onwuamah, 2014). Aparentemente a aderência é decorrente da formação de complexos entre xenobióticos e grupos fosfatos do DNA (Iqbal *et al.*, 2019; Turkoglu, 2007). Esse mecanismo parece compatível com o mecanismo de ação molecular do TDF, uma vez que, no meio intracelular, o tenofovir sofre fosforilação, sendo o produto difosfatado o responsável pela interação com a enzima transcriptase reversa, podendo ocorrer paralelamente outros processos de interação com outros sítios celulares.

As alterações nucleares correspondem a variações morfológicas nos núcleos durante o ciclo celular. As alterações nucleares encontradas foram principalmente a formação de brotos e micronúcleos(Fig.4.1).

**Figura 4.1 Fotomicrografias de alterações nucleares induzidas por TDF nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*; (a) broto nuclear (b) brotos nucleares e micronúcleos (c) micronúcleos**



A formação de brotos é um importante índice associado à genotoxicidade, Fernandes *et al.* (2007), em estudo do herbicida trifluralina sobre *A. cepa* sugerem que os brotos sejam formados por poliploidização, quando o material genético amplificado forma uma saliência nuclear, sendo posteriormente liberado da célula, dando origem ao micronúcleo.

A formação de micronúcleos é uma indicação de efeito mutagênico (*Abdel Migid et al., 2007*), uma vez que essa alteração não pode ser reparada. Exceto na concentração  $0,27\text{mg.L}^{-1}$ , concentrações da série 1 (Tab.4.4), apresentaram diferença significativas no índice de micronúcleos em relação ao controle. De acordo com os resultados obtidos na série 1, o número de micronúcleos formados na região meristemática está diretamente relacionado à concentração de TDF. Na série 2, nas concentrações mais altas, embora prevaleça a formação de micronúcleos a tendência de aumento do IMN com a concentração não se mantém. Provavelmente porque, nessas concentrações, prevaleçam outros mecanismos de toxicidade que inviabilizam a replicação celular.

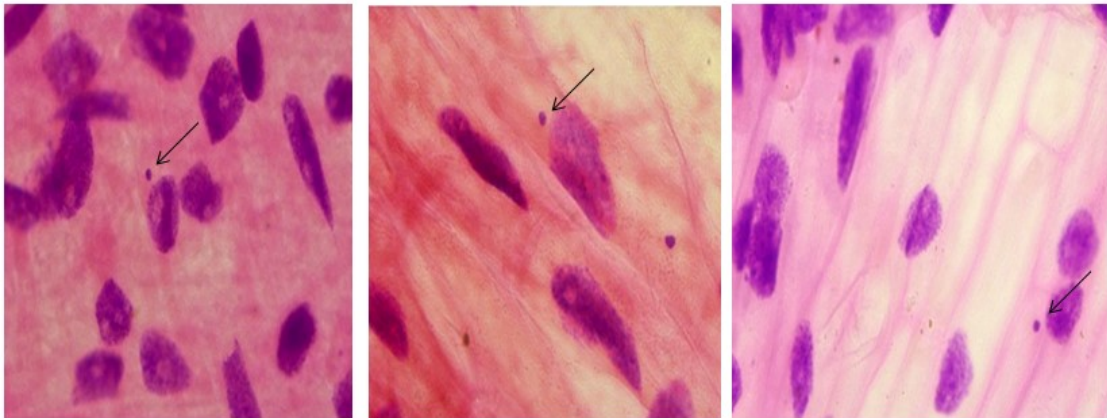
**Tabela 4.4 - Índice de Micronúcleos em células da região meristemática de raiz de *Allium cepa* em diferentes concentrações de TDF**

Concentração de TDF (mg.L <sup>-1</sup> )	IMN	95% IC	99.2% IC para diferença (Correção de Bonferroni)		
			0.27	26.50	265.00
CN	0.0012	(0.0005;0.0027)	(-0.0054;0.0002)	(-0.0088;-0.0019)	(-0.0143;-0.0057)
0.27	0.0038	(0.0023;0.0060)	-	(-0.0067;0.0012)	(-0.0122;-0.0027)
26.50	0.0065	(0.0046;0.0093)	-	-	(-0.0098;0.0005)
265.00	0.0112	(0.0065;0.0146)	-	-	-

Diferenças significativas evidenciadas em células acinzentadas. ( $\alpha = 0.0083 \Rightarrow \alpha_{global} = 0.05$ )  
 IMN = Índice de micronúcleos, IC = Intervalo de confiança, CN = Controle negativo

A região F1 localiza-se diretamente acima da região meristemática, apresenta poucos milímetros de comprimento e menor índice de divisão celular que a região meristemática. É o local onde ocorre o alongamento das raízes. Essa região da raiz apresenta células com maior dimensão que as células meristemáticas, sendo alongadas, com vacúolos de grandes dimensões, núcleos pequenos e um citoplasma muito reduzido situado entre a membrana celular e os vacúolos (*Raven et al., 2007*). Alterações persistentes nessa região indicam efeitos não reparados, considerados efeitos mutagênicos (*Correa Martins et al., 2016*). Verificou-se, na região F1, a persistência dos micronúcleos (Fig.4.2). Contudo na série 1 observou-se diferença significativa do IMN em relação ao controle apenas na maior concentração ( $265.00\text{ mg.L}^{-1}$ ), ao passo que na série 2 apenas na mais alta concentração ( $2800.00\text{ mg.L}^{-1}$ ) não foi observada diferença significativa quando comparada ao controle.

**Figura 4.2 Fotomicrografias de micronúcleos induzidos por TDF nas células região F1 da raiz de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de TDF**



Esses resultados indicam que na concentração de TDF de  $0.27\text{mg.L}^{-1}$ , mais próxima da detectada por Ncube *et al.* (2018), em rios na África, não parece estar associada a danos genotóxicos ou mutagênicos. Os dados obtidos para o TDF usando o modelo do *A. cepa* mostraram-se consistentes com resultados descritos por Moraes Filho *et al.* (2017), ao avaliarem a genotoxicidade dos antivirais Efavirenz e TDF usando teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos *Mus musculus*. Esses pesquisadores observaram a mesma tendência da apresentação de efeitos mutagênicos somente frente a concentrações dos fármacos superiores à concentração plasmática. Destaca-se a boa correlação entre os modelos experimentais para avaliação e genotoxicidade usando células animais e a espécie *A. cepa*. Verifica-se que, apesar da competição com o substrato natural da TR e, possivelmente de outras enzimas envolvidas na replicação celular, estes ARVs não mostraram significativa atividade citogenotóxica, nas concentrações ambientais próximas às concentrações plasmáticas médias de pacientes em uso desses medicamentos.

Diante dos resultados desse estudo, pode-se inferir, que em doses baixas, há seletividade em relação à enzima viral, porém, quando as doses são aumentadas, enzimas similares de outras espécies podem ser inibidas, afetando a síntese do DNA e a replicação celular.

Várias substâncias provenientes de atividades antropogênicas lançadas em águas superficiais têm sido associadas ao surgimento de alterações no desenvolvimento de animais e plantas aquáticas (Cavicchioli *et al.*, 2019; Schütte *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2018; Stancova *et al.*, 2017). Isso pode resultar em eliminação,



e alteração do patrimônio genético e da fertilidade de outras espécies, comprometendo todo o ecossistema. Embora as concentrações do TDF que apresentaram efeitos citogenotóxicos possam ser consideradas altas em relação aos níveis ambientais, alguns modelos experimentais com outras espécies consideram que concentrações de efeito abaixo de  $100\text{mg.L}^{-1}$  indicam toxicidade ambiental (GHS, 2017).

No Brasil, grande parte das águas superficiais são utilizadas na irrigação e no manejo animal, o que constitui uma preocupação adicional com a contaminação dos corpos d'água por compostos de origem antropogênica e, especialmente, por fármacos. Além desses fatores não se conhece o potencial de bioacumulação do TDF, o que pode significar um risco para o uso doméstico da água com implicações na saúde pública

## CONCLUSÕES

A germinação das sementes de *A. cepa* não foi afetada, mesmo em concentrações de TDF, incompatíveis com sua presença no ambiente.

Verificou-se que o TDF, nos testes com concentrações variando de  $0.27\text{ mgL}^{-1}$  a  $265\text{mg.L}^{-1}$ , apresentou discreto aumento do índice mitótico. Ao contrário, houve na série de concentrações de 300 a  $2800\text{ mg.L}^{-1}$  significativa redução do IM com inibição da proliferação celular superior a 80%.

As aderências foram as aberrações cromossômicas mais frequentes. No entanto também observou-se formação de brotos e micronúcleos tanto na região meristemática quanto na região F1.

As alterações genotóxicas observadas nas células de *A. cepa* expostas ao TDF indicaram potencial genotóxico observado na região meristemática e sua persistência na região F1, indicando o potencial mutagênico do fármaco em concentrações maiores que 100 vezes a concentração plasmática. Esses resultados são compatíveis com as características moleculares do TDF e seu mecanismo de ação por terminação precoce da replicação de DNA. Por se tratar de um análogo de nucleotídeo, é possível que em altas concentrações, o TDF possa inibir enzimas similares de outras espécies relacionadas à replicação do DNA, desencadeando efeitos genotóxicos e mutagênicos.

Diante disso, os aspectos relativos aos resíduos do TDF no ambiente não podem ser negligenciados. Os resultados do teste com *A. cepa* sugerem cautela quanto ao lançamento de esgotos contendo resíduos desse fármaco em águas superficiais.

Destaca-se que na terapia de pessoas vivendo com HIV são utilizadas associações de fármacos antivirais, inclusive análogos de nucleosídeos que podem ter efeitos somatórios em relação à toxicidade podendo afetar a sobrevivência e integridade gênica de espécies aquáticas.

## Referências

- Abdel-Azeem E A. The detrimental effects and mutagenical potential of Schiff base sulfadiazine derivative engineered particles on *Allium cepa* (L). Report and Opinion. 2014; 6: 48-58.
- Abdel Migid H M, Azab Y A, Ibrahim W M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safet.* 2007; 66(1),57–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.011
- Albertini R J, Anderson D, Douglas G R et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 2000; 463(2)111-172.
- Araújo A S F, Monteiro R T R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola.* 2005; 62(3): 286-290.
- Bianchi J, Espindola E L G, Marin-Morales M A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2011; 74: 826-833.
- Bianchi J, Mantovani M S, Marin-Morales M A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *J. Environ. Sci.* 2015; 36:102-111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.034>
- Brooks K M, Ibrahim M E, Castillo-Mancilla J R, et al. Pharmacokinetics of tenofovir monoester and association with intracellular tenofovir diphosphate following single-dose tenofovir disoproxil fumarate. *J Antimicrob Chemother.* 2019 <https://doi:10.1093/jac/dkz187v>.
- Broder, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Research.* 2010; 85(1), 1–18. doi:10.1016/j.antiviral.2009.10.00
- CARVALHO N M, NAKAGAWA J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*, Jaboticabal: 4.ed. FUNEP; 2000. 588p.
- Cavicchioli R, Ripple W J, Timmis K N, et al. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 569–586 doi:10.1038/s41579-019-0222-5
- Cohen M S, Hellmann N, Levy, J A, et al. The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(4): 1244-1254.
- Cooper R D, Wiebe N, Smith N, et al. Systematic review and meta-analysis: renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases.* 2010; 51(5): 496-505.

Corrêa Martins M N, Souza V V, Silva Souza, T. *Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on Allium cepa*. *Chemosphere*. 2016; 148: 481–486. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.07

Moraes Filho A V, Carvalho C D J S, Verçosa C J, et al. In vivo genotoxicity evaluation of efavirenz (EFV) and tenofovir disoproxil fumarate (TDF) alone and in their clinical combinations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017; 820:31-38.

Oliveira V P C, de Sousa G R, de Araujo M P T, et al. Evaluation of the Mutagenic Potential of Glucocorticoids by *Allium cepa*. *Mutagenesis*. 2017; 7(1):1-7.

Fernandes T C, Mazzeo D E C, Marin-Morales M A, Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007; 88(3):252-259.

Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985;102:99-112

GHS (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. United Nations, New York.

Grisolia C K, Takahashi C S. Evaluation of mutagenic effect of the antihypertensive drug methyldopa (Aldomet) on mammalian systems in vivo and in vitro and on *Allium cepa*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1991; 259(2):127–132. doi:10.1016/0165-1218(91)90046-o

Gupta P, Mathur N, Bhatnagar P, Nagar P, Srivastava S. Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72, 1925–1932.

Hara R V, Marin-Morales M A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State–Brazil). *Chemosphere*. 2017;174:321-330.

Herrero O, Martín P, Freire P F, et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2012;743(1-2):20-24.

Holec A D, Mandal S, Prathipati P K, et al. Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Thorough Review, Present Status and Future Perspective as HIV Therapeutics. *Current HIV Research*. 2018;15(6). doi:10.2174/1570162x15666171120110145

Kwasniewska J, Nałęcz-Jawecki G, Skrzypczak A, et al. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012; 75:55–62. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.08.020

Leme D M, Marin-Morales M A, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2009; 682(1):71–81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002

Limmer M A, Burken J G, Plant Translocation of Organic Compounds: Molecular and Physicochemical Predictors. *Environmental Science & Technology Letters*. 2014; 1(2): 156–161. doi:10.1021/ez400214q

Lutterbeck C A, Kern D I, Machado Ê L, et al. Evaluation of the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation. *Chemosphere*. 2015; 135: 403–410. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.01

Iqbal M, Abbas M, Nisar J, et al. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: a review. *Chemistry International*. 2019; 5(1):1-80.

Maluszynska J, Juchimiuk J. Plant Genotoxicity: A Molecular Cytogenetic Approach in Plant Bioassays. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*. 2005; 56:177-184.

Oliveira, L E M. Temas em fisiologia Vegetal, Lavras, 2015, Disponível em: <http://www.ledson.ufla.br/metabolismo-da-germinacao/morfologia-de-sementes>.

Acesso em: 11.Dez.2019.

Marchi G, Herbicidas: mecanismos de ação e uso. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2008. 36p. Mišík M, Pichler C, Rainer B, et al. Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: possible impact on the environment. *Environmental Research*. 2014; 135:196-203.

Musanovic J, Ramic N, Nefic H, et al. Chromosome aberration and irregular cell cycle in *Allium cepa* root cells caused by different concentrations of Alprazolam. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*. 2013; 5(6): 407.

Ncube S, Madikizela L M, Chimuka L, et al. Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. *Water Research*. 2018; 145:231-247. doi:10.1016/j.watres.2018.08.017

Ngozi E, Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2011; 3(2):44-51.

Onwuamah C K, Ekama S O, Audu R A. et al. Exposure of *Allium cepa* Root Cells to Zidovudine or Nevirapine Induces Cytogenotoxic Changes. *PLoS ONE*; 2014; 9(3),e90296. doi:10.1371/journal.pone.0090296

Pan M, Chu L M. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2016; 126: 228-237.

Patterson S, Cescon A, Samji H, *et al.* Life expectancy of HIV-positive individuals on combination antiretroviral therapy in Canada. *BMC infectious diseases*. 2015;15(1): 274.

Pullagurala V L R, Rawat S, Adisa I O, *et al.* Plant uptake and translocation of contaminants of emerging concern in soil. *Science of The Total Environment*. 2018; 636:1585–1596. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.375 Voet D, Voet JG. *Biochemistry, New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.*

Raven P. H, Evert R F, Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*, 7. ed., Rio de Janeiro Guanabara-Koogan, 2007. 876p.

R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna: 2019. URL <https://www.R-project.org/>.

Rodríguez Y A, Christofolletti C A, Pedro J, *et al.* *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. *Chemosphere*. 2015; 120: 438-442.

Stancova V, Pihalova L, Blahova J, *et al.* Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*). *Veterinárň í medicína*. 2017; 62(2):90-97.

Stephen J. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the *Allium* test. *Cytologia*. 1980; 45(4):769-777.

Schütte G, Eckerstorfer M, Rastelli V, *et al.* Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*. 2017; 29(1):5.

TEIXEIRA, M. O. N. Desenvolvimento de métodos de determinação de tenofovir para aplicação em controle de qualidade e estudo de bioequivalência/biodisponibilidade relativa. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Teeraananchai S, Kerr S, Amin J, *et al.* Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Medicine*. 2016; 18(4): 256–266. doi:10.1111/hiv.12421

Türkođlu Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2007; 626(1-2):4-14.

Ullah S, Zuberi A, Alagawany M, *et al.* Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. *Journal of environmental management*. 2018; 206:863-871.

Vega L E, Espinoza L R. HIV infection and its effects on the development of autoimmune disorders. *Pharmacological research*. 2018; 129:1-9.

Yilmaz, G, Kaya, Y, Vergili, I *et al*. Characterization and toxicity of hospital wastewaters in Turkey. *Environ Monit Assess*. 2017; 189, 55  
<https://doi.org/10.1007/s10661-016-5732-2>

Yoshimura K. Current status of HIV/AIDS in the ART era. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2017. 23(1):12–16. doi:10.1016/j.jiac.2016.10.002

Wood T P, Duvenage C S J, Rohwer E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. *Environ Pollut*. 2015; 199:235-243. <https://doi:10.1016/j.envpol.2015.01.030>

## CAPÍTULO 5

### 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na atualidade, uma extensa produção científica tem se referido à contaminação ambiental por fármacos, tem demonstrado sua presença em diversas classes de corpos d'água, inclusive em água potável em diversas regiões do planeta. Esse problema ambiental se intensifica em países com deficiência no saneamento básico, como acontece em países em desenvolvimento.

No ambiente, resíduos de fármacos podem exercer efeitos deletérios sobre diversos organismos que não são o alvo dos medicamentos. O impacto dessa exposição se faz sentir por meio de várias alterações, especialmente nas comunidades aquáticas, que podem levar tanto a inviabilidade e extinção de organismos em sítios contaminados, quanto a alteração na integridade desses organismos o que se estende por gerações, em função do comprometimento de seu patrimônio genético.

O grande número de pessoas vivendo com o HIV/AIDS, o aumento na expectativa de vida dessas pessoas e o tratamento por toda a vida com ARVs sugere a necessidade do monitoramento desses fármacos no ambiente, uma vez que além dos efeitos diretos sobre a biota aquática pode ocorrer acumulação de resíduos na cadeia alimentar, com possível risco à saúde pública. Isso aponta a importância e necessidade de novos estudos tanto de toxicidade quanto de processos de tratamento para redução da quantidade desses fármacos que chegam às águas superficiais.

É importante ressaltar que, no ambiente em geral e no meio aquático em particular, as espécies estão expostas a múltiplos poluentes, inclusive fármacos. No caso dos ARVs, esses são usados, nos esquemas terapêuticos atuais, em associação, em geral de três fármacos dessa classe, os quais podem agir pelo mesmo mecanismo. O TDF em sua formulação mais comum está associado aos antirretrovirais Lamivudina e Dolutegravir. Essa é uma preocupação adicional, pois pode indicar uma potencialização do efeito tóxico desses fármacos, atingindo os organismos ambientalmente expostos. Assim, os resultados deste estudo apontam a necessidade de pesquisas de efeitos dos ARVs em associação e dos efluentes reais a fim de estimar o risco ambiental dessas substâncias.



Esse estudo chama a atenção das instituições de ensino da área de farmácia para a importância de incluir as discussões da questão ambiental nos currículos, sensibilizando e qualificando os farmacêuticos para atuação na área ambiental.

Finalmente destaca-se que as parcerias estabelecidas entre a Faculdade de Farmácia da UFMG com a Fundação Ezequiel Dias e com o Laboratório de Limnologia Ecotoxicologia e Ecologia Aquática-LIMNEA /ICB/ UFMG, com a colaboração do Prof. Francisco Antonio Rodrigues Barbosa garantiram o acesso a infra-estrutura necessária que foi fundamental para a execução da pesquisa.

Como indústria farmacêutica, a FUNED no exercício de seu papel social como responsável pela destinação dos resíduos gerados, poderá se beneficiar dos resultados obtidos na perspectiva de aprimorar o tratamento dos efluentes e o gerenciamento de risco ambiental de sua atividade produtiva.

O estudo realizado permitiu algumas conclusões acerca do risco ambiental do tenofovir desoproxil.

Avaliando-se o impacto ambiental sobre vários organismos aquáticos, foi possível concluir que, entre os organismos teste utilizados para estimar a toxicidade do TDF, o *A. fischeri* foi o modelo mais sensível, quando comparado à cianobactéria *M. novacekii* e ao microcrustáceo *A. salina*. A bactéria luminescente *A. fischeri* constitui um organismo teste muito utilizado na avaliação de toxicidade ambiental.

Esse resultado chama atenção pelo fato de nossos principais sistemas de tratamento de esgoto e de efluentes industriais serem plantas de biodegradação anaeróbica. Efeitos de xenobióticos sobre bactérias saprófitas como o *A. fischeri* podem indicar que organismos decompositores possam também ser inibidos pelo TDF, levando a uma limitação da degradação de resíduos nas estações de tratamento.

Neste estudo, experimentos realizados com a degradação do TDF indicaram que a cianobactéria *Microcystis novacekii* demonstrou grande resistência a altas concentrações do TDF e, em laboratório, mostrou potencial para biodegradação do fármaco. Embora a biodegradação por cianobactérias mixotróficas seja um processo limpo que, além da eliminação dos resíduos do poluente, leva a fixação de carbono e geração de oxigênio, em se tratando do TDF, o processo mostrou-se muito lento. Normalmente, dentro da produção industrial é desejável uma degradação mais rápida, compatível com os ciclos de produção.

Substâncias potencialmente recalcitrantes demandam o desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento. No caso da biodegradação deve-se investir no aprimoramento da composição das culturas com a introdução de outras espécies e o consórcio com bactérias decompositoras a fim de potencializar a degradação do poluente

Avaliou-se também o processo de degradação oxidativa pelo reagente de Fenton. Os resultados dos ensaios de degradação oxidativa mostraram grande rapidez do processo, porém formação de produtos secundários, com toxicidade desconhecida. Desse modo, embora eficientes, os dois métodos estudados apresentaram limitações para a eliminação total dos resíduos do TDF. Uma possível solução seria um acoplamento dos dois métodos, buscando a mineralização desse poluente. Essa estratégia pode constituir uma boa alternativa visando a redução do lançamento de resíduos desse fármaco em águas superficiais.

Há uma grande preocupação da comunidade científica com os efeitos de fármacos e outros poluentes sobre a integridade genética das populações expostas a essas substâncias. No caso dos inibidores da transcriptase reversa, essa é uma preocupação justificável em função do mecanismo de ação desses fármacos. O estudo de citogenotoxicidade realizado mostrou que o TDF apresenta potencial genotóxico e mutagênico em concentrações cerca de 100 vezes maiores que a concentração plasmáticas média em humanos, o que suscita novos estudos de avaliação de efeitos desse fármaco sobre a síntese de DNA de outras espécies expostas.

Considera-se, assim, que esse estudo atingiu os objetivos propostos e os resultados podem alertar para a importância da questão de resíduos de fármacos como poluentes emergentes.

## 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.066
- ABDEL-AZEEM E. A. The detrimental effects and mutagenical potential of Schiff base sulfadiazine derivative engineered particles on *Allium cepa* (L). **Report and Opinion**. v.6, p. 48-58, 2014.
- ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: Renew. **Sust Energ Rev**, v.52, p.123-132, 2015. [https:// doi:10.1016/j.rser.2015.07.086](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086)
- AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. **Environ Toxicol Chem**, v.35, n.1, p.36-46, 2016. [https://doi:10.1002/etc.3144](https://doi.org/10.1002/etc.3144)
- ANDREATTA, K. M.; MILLER, M. D. P.; WHITE, K. L. P. HIV-2 antiviral potency and selection of drug resistance mutations by the integrase strand transfer inhibitor elvitegravir and NRTIs emtricitabine and tenofovir in vitro. **The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.62, p.367-74, 2013.
- ARULVASU, C *et al.* Toxicity Effect of Silver Nanoparticles in Brine Shrimp *Artemia*. **The Scientific World Journal**, 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/256919
- AY, F.; KARGI, F. Advanced oxidation of amoxicillin by Fenton's reagent treatment. **J Hazard Mater**, v.179, p.1-3, 2010 . <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.048>
- AZBAR, N.; YONAR, T.; KESTIOGLU, K. Comparison of various advanced oxidation processes and chemical treatment methods for COD and color removal from a polyester and acetate fiber dyeing effluent. **Chemosphere**, v.55 n.1, p. 35-43, 2004. [https://doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.046](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.046)
- BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. **J Environ Chem Eng**, v. 2 n. 1, p. 557-572, 2014. [https://doi:10.1016/j.jece.2013.10.011](https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.011)
- BADAWY, M. I.; WAHAAB, R. A.; EL-KALLINYA, S. Fenton-biological treatment processes for the removal of some pharmaceuticals from industrial wastewater. **J Hazard Mater**, v.167 n.1-3, p.567-574, 2009. [https://doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.023](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.023)
- BALZARINI, J. *et al.* Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p. 332-338, 1993.

BASELGA-CERVERA, B. *et al.* Assessing the effect of high doses of ampicillin on five marine and freshwater phytoplankton species: a biodegradation perspective. **Journal of Applied Phycology**. 2019. doi:10.1007/s10811-019-01823-8

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 826-833, 2011.

BOKARE, A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. **J Hazard Mater**, v. 275 p. 121-135, 2014. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>

BRASIL Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA. Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos*. Brasília, 2018.

BRIERLEY, A. S. Plankton. **Current Biology**, v.27, n.11, R478–R483, 2017. doi:10.1016/j.cub.2017.02.045

Brierley, A. S. Plankton. **Current Biology**, v.27, n.11 p.R478–R483, 2017. doi:10.1016/j.cub.2017.02.045

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral research**, v. 85, n.1, p.1-18, 2010

BROOKS, K. M. *et al.* Pharmacokinetics of tenofovir monoester and association with intracellular tenofovir diphosphate following single-dose tenofovir disoproxil fumarate. **J Antimicrob Chemother**, v.74, n.8, p. 2352-2359, 2019. <https://doi:10.1093/jac/dkz187v>.

BROWNE, R A. **Artemia Biology: 0**. CRC press, 2018.

CAPELA, F. S. Avaliação de biomarcadores. Dept. de Biologia, Universidade de Évora. 2001.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, n. 1, p. 78-86, Jan. 1994

CARTAGENA, A. F; *et al.* New denture adhesive containing miconazole nitrate polymeric microparticles: Antifungal, adhesive force and toxicity properties. **Dental Materials**, v.33, n.2, p. e53–e61, 2017. doi:10.1016/j.dental.2016.09.039

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Identificação e Contagem de Algas Fitoplanctônicas com Ênfase em Cianobactérias: noções básicas. São Paulo: CETESB, 2004. 47 p. (Série Cursos e Treinamentos).

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de cianobactérias planctônicas : legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais / CETESB ; Maria do Carmo Carvalho ... [et al.]. -- São Paulo : CETESB, 2013.

CHEKROUN, K. B.; SÁNCHEZ, E.; BAGHOUR, M. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. **International Research Journal of Public and Environmental Health**, v.1, n.2, p.19-32, 2014.

COSTA, R. C. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, São Paulo, V. 31, n. 7, set 2008. Disponível m:<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a38.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2016.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, v.6, n.1, p.33-38, 2012

DAOUK, S. *et al.* Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. **J Environ Manage**, v. 160, p. 324-332, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.037>

DE CHRISTOFORO, R.; PENZAK, S. R. Tenofovir: a nucleotide analogue reverse-transcriptase inhibitor for treatment of HIV infection. **American Journal of Health-system Pharmacy**, v.61, n.1, p. 86-98, 2004.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. **Antiviral Research**, v.75, p 1-13, 2007.

EI-BESTAWY, E. A.; AB EI-SALAM, A. L.; MANSY, A. E. R. Potencial use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 59, p. 180-192, Apr. 2007.

FABBRI, E. Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1340, n.1, p. 20–28, 2015. <https://doi:10.1111/nyas.12605>.

FENT, K. W. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. **Aquatic toxicology**, V.76, p.122-159, 2006.

FICK, J. *et al.* Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. **Regul Toxicol Pharmacol** v. 58, n.3, p. 516-523, 2010. <https://doi:10.1016/j.yrtph.2010.08.025>

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GAUR, N.; NARASIMHULU, K.; PYDISETTY, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. **J Clean Prod**, v. 198 p.1602-1631, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.076>

GEBOERS, S. Intestinal behavior of the ester prodrug tenofovir DF in humans. **Int J Pharm**, v.485, n.1-2 p.131-7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.002>.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.141, p. 259-270, 2017.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. A. Z. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment-A review. **Chemosphere**, v.138, p. 281-291, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.024>

GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-ROLDAN, R.; CORTINA, J. L. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. **Environmental Pollution**, v.161, p.83-92, 2012.

GONZÁLEZ-PLEITER, M *et al.* Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. **Water Research**, v.47 n.6, p. 2050–2064, 2013. doi:10.1016/j.watres.2013.01.020

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-185, 1994.

GREGOR, C. *et al.* Strongly enhanced bacterial bioluminescence with the lux operon for single-cell imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115 n.5, p. 962–967, 2018. doi:10.1073/pnas.1715946115

GRISOLIA C. K; TAKAHASHI C S. Evaluation of mutagenic effect of the antihypertensive drug methyldopa (Aldomet) on mammalian systems in vivo and in vitro and on *Allium cepa*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**. v..259, n.2, p.127–132, 1991. doi:10.1016/0165-1218(91)90046-o

HANNA, N. *et al.* Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. **Environ Int**, v. 114 p. 131-142, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State–Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p.321-330, 2017.

HARTMANN, A. *et al.* Primary DNA Damage But Not Mutagenicity Correlates with Ciprofloxacin Concentrations in German Hospital Wastewaters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.36, n.2, p.115-119, 1999.

HE, Z. *et al.* Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 781–789, 2016. doi:10.1016/j.molliq.2016.09.005

HERNANDO, M. *et al.* Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v.69, n.2, p.334-342, 2006. <https://doi:10.1016/j.talanta.2005.09.03>

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.743, n.1-2, p.20-24, 2012.

HOUCK, V. S. Genetic analysis of the mitotic spindle. **Annu. Rev. Genet.**, v.30 p. 7-33, 1992.

ISIDORI, M *et al.* Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. **Environ Int** , v.33, n.5, p.635-641, 2007. doi:10.1016/j.envint.2007.01.00

JACOB, R. S. *et al.* A toxicity assessment of 30 pharmaceuticals using *Aliivibrio fischeri*: a comparison of the acute effects of different formulations. **Environmental Technology**, v. 37 n.21, p. 2760–2767, 2016. doi:10.1080/09593330.2016.116424

KAISER, K. L. E. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. **Environ Health Perspect**, v. 106, n. 2, p. 583– 591, 1998

KEARNEY, B. P.; FLAHERTY, J. F.; SHAH, J. Tenofovir disoproxil fumarate clinical pharmacology and pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetics**. v.43, p.595-612, 2004.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **J Environ Manage**, v.90, n.8, p.2354-2366, 2009. <https://doi:10.1016/j.jenvman.2009.01.023>

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A. Estimation of the cancer risk to humans resulting from the presence of cyclophosphamide and ifosfamide in surface water. **Environmental Science and Pollution Research**. v.17, n.2, p.486-96, 2010.

KÜMMERER, K.; Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic AIDS and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. **Chemosphere**, v.45, n.6–7, p.957-69, 2001.

KUSTER, A.; ADLER, N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.369, p.1656, 2014. doi:10.1098/rstb.2013.058

LACEN- Pe - Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco. **Curso de Revisão de Métodos Analíticos em Cianobactérias**, Recife, 2008. 27 p.

LEITE, D. I. *et al.* Tenofovir: Relação Estrutura-Atividade e Métodos de Síntese: Structure-Activity Relationship and Synthetic Methods. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.2347-2376, ago. 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em: <<http://rvq.sbq.org.br>>. Acesso em: 07 jul. 2017.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. v.682, n.1, p.71–81, 2009. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LUO, Y. *et al.* A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Sci Total Environ**, v.473, p.619-641, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

MAHMOOD, A. R.; AL-HAIDERI, H. H.; HASSAN, F. M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. **Advances in Public Health**, 2019. <https://doi:10.1155/2019/7851354>

MAROUANE, C. H. O. T. T. Aspects of life history of *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) from Algeria reared in different conditions of salinity. **Vie et Milieu-life and Environment**, v.67, n.1, p.15-20, 2017.

MASELLI, B. S. *et al.* Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical company: a comparison of the sensitivities of different standardized tests. **Ecotoxicology**, v.24, n.4, p.795-804, 2015.

MASHO, S. W.I.; WANG, C.; NIXON, D. E. Review of tenofovir-emtricitabine. **Therapeutics and clinical risk management**, v.3, n.6, p. 1097, 2007.

MATAVOS-ARAMYAN, S.; MOUSSAVI, M. Advances in Fenton and Fenton based oxidation processes for industrial effluent contaminants control—a review. **Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour**, v. 2, n. 4, p. 1-18, 2017.

MEINTJES, G. *et al.* Adult antiretroviral therapy guidelines. **S Afr J HIV Med**, v.18 n.1, 2017. <https://doi.org/10.4102/sajhivmed.v18i1.776>

MENNILLO, E. *et al.* Ecotoxicological properties of ketoprofen and the S(+)-enantiomer (dexketoprofen): Bioassays in freshwater model species and biomarkers in fish PLHC-1 cell line. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.37, n.1, p. 201–212, 2018

MERCYKUTTY, V. C.; STEPHEN, J. Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the *Allium* test. **Cytologia**, v.45 n.4, p.769–777, 1980. doi:10.1508/cytologia.45.769

MINAGH, E. *et al.* Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, n.2, p. 434–44, 2009.

MIRZAEI, A. *et al.* Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogonous Fenton-type processes – A review. **Chemosphere**, v.174 p. 665–688, 2017. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.019



MIŠÍK, M. *et al.* Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: possible impact on the environment. **Environmental research**, v.135, p.196-203, 2014.

MORAES REIS, A. C., NASCIMENTO PONTES, A. Diagnóstico e desafios no saneamento básico no Brasil. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, DEZ, 2019.

MOSS D. M. *et al.* Simulating intestinal transporter and enzyme activity in a physiologically based pharmacokinetic model for tenofovir disoproxil fumarate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61 n.7, 2017. doi:10.1128/aac.00105-17

MURPHY, R. A.; VALENTOVIC, M. A. Factors Contributing to the Antiviral Effectiveness of Tenofovir. **J Pharmacol Exp Ther**, v.363, n.2, p.156-163, 2017. https://doi:10.1124/jpet.117.243139

NCUBE, S. *et al.* Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives. **Water Res**, v.145, p. 231-247, 2018. https://doi:10.1016/j.watres.2018.08.017

NEFIC, H. *et al.* Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L.. induced by alprazolam. **Medical Archives**, v.67, n.6, p. 388, 2013

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v.567, n.2–3, p.109-49, 2004.

OLIVEIRA, V. P. C. *et al.* Evaluation of the Mutagenic Potential of Glucocorticoids by *Allium cepa*. **Mutagenesis**, , v.7, n.1, p. 1-7, 2017

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination - A review. **Sci Total Environ**, v.409, n.20, p. 4141-4166, 2011. https://doi:10.1016/j.scitotenv.2010.08.06

ONWUAMAH C. K. *et al.* Exposure of *Allium cepa* Root Cells to Zidovudine or Nevirapine Induces Cytogenotoxic Changes. **PLoS ONE**; v.9, n.3, 2014. e90296.doi:10.1371/journal.pone.0090296

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD **Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines** Nov 2015.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidelines for testing chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. 201.** Mar. 2006.

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

RAJABI, S. *et al.* Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.1, p.20, 2015.

RANA, R. S. *et al.* A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries' wastewater: an Indian perspective. **Applied Water Science**, v.7, n.1, p.1-12, 2017.

REMINGTON, J. P.; BERINGER, P. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 2393 p.

RODRÍGUEZ, Y. A. *et al.* Allium cepa and Tradescantia pallida bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v.120, p. 438-442, 2015.

ROIG, N. *et al.* In vitro tests to assess toxic effects of airborne PM10 samples. Correlation with metals and chlorinated dioxins and furans. **Science of The Total Environment**, v.443, p.791–797, 2013. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.022

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**; Morales, G. C., ed.; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004. 189 p.

RZYMSKI, P.; DREWEK, A.; KLIMASZYK, P. Pharmaceutical pollution of aquatic environment: an emerging and enormous challenge. **Limnol Review**, v. 17 n.2 p.97-107, 2017. <https://doi:10.1515/limre-2017-0010>

SHARMA, A.; AHMAD, J.; FLORA, S. J. S. Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products. **Environ Res**, v.167 p. 223–233, 2018. <https://doi:10.1016/j.envres.2018.07.010>

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, v.100, n.7, p.2138-46, 2009.

TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment - the "problem" in perspective. **Chemosphere**, v.115, p.95-9, 2014.

TEERAANANCHAI, S. *et al.* Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. **HIV Medicine**, v.18, n.4, p.256–266, 2016. doi:10.1111/hiv.12421

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. WHO Drug Information. World Health, 2016

TOLBOOM S. N. *et al.* Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment – A review. **Sci Total Environ**, v.665 p. 358–366, 2019. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.129>

UNAIDS, Relatório informativo – dia mundial contra a aids 2019 estatísticas globais sobre HIV(2019) Disponível em : <https://unaid.org.br/> Acesso em 02. Dez 2019

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. **Química Nova**, v.27, n.1, p. 139-145, 2004.

VIEGA, B. L.; ROCHA, A. M.; DÜSMAN, E. Cosmetics with hormonal composition for bioindicators *Artemia salina* L. and *Allium cepa* L. toxic potential. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019 doi:10.1007/s11356-019-07392-0

WANG, Y. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **Bioresour Technol**, v.222 p. 485-497, 2016. <https://doi:10.1016/j.biortech.2016.09.106>

WEBER, C. I. *et al.* (1991). **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Cincinnati, OH: Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1991.

WELTENS, R.; DEPREZ, K.; MICHIELS, L. Validation of Microtox as a first screening tool for waste classification. **Waste management**, v.34, n.12, p.2427-2433, 2014.

WOOD, T. P.; DUVENAGE, C. S. J.; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environ Pollut** v.99, p.235-243, 2015. <https://doi:10.1016/j.envpol.2015.01.030>

WU, Y.; LI, T.; YANG, L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review. **Bioresour Technol**, v.107, p.10-18, 2012. <https://doi:10.1016/j.biortech.2011.12.088>

XIAO, M.; LI, M.; REYNOLDS, C. S. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. **Biol Rev**, v.93, n.3, p.1399-1420, 2018. <https://doi:10.1111/brv.12401>  
YAMAMOTO, H. *et al.* Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. **Environ Sci**, v.14, n.4, p.177-93, 2007.

YANG, H. *et al.* Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine resistance HBV. **Antiviral Therapy**. v.10, p. 625-33, 2005.

ŽEGURA, B. *et al.* Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**. v.75, n.11, p.1453-60, 2009.

ZHANG, M. *et al.* A review on Fenton process for organic wastewater treatment based on optimization perspective. **Sci Total Environ**, v.670 p. 110–121, 2019. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.180>

ZHANG, Y. G. S.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**. v.73, n.8, p.1151-61, 2008