

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

JULIANA SOUKI DINIZ

**TOXICIDADE AMBIENTAL DO INGREDIENTE ATIVO FARMACÊUTICO
NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA**

Belo Horizonte
2022

JULIANA SOUKI DINIZ

**TOXICIDADE AMBIENTAL DO INGREDIENTE ATIVO FARMACÊUTICO
NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica da Faculdade de Farmácia de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Medicamentos e Assistência Farmacêutica na linha de pesquisa de Medicamento em Populações

Orientadora:
Dr^a Micheline Rosa Silveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador:
Dr. Marcos Paulo Gomes Mol
Fundação Ezequiel Dias

Belo Horizonte

2022

D585t Diniz, Juliana Souki.
Toxicidade ambiental do ingrediente ativo farmacêutico nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina [recurso eletrônico] / Juliana Souki Diniz. – 2022.
1 recurso eletrônico (152 f. : il.) : pdf

Orientadora: Micheline Rosa Silveira.
Coorientador: Marcos Paulo Gomes Mol.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Nevirapina – Teses. 2. Toxicidade – Teses. 3. Medicamentos – Teses. I. Silveira, Micheline Rosa. II. Mol, Marcos Paulo Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.9



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

TOXICIDADE AMBIENTAL DO INGREDIENTE ATIVO FARMACÊUTICO NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA

JULIANA SOUKI DINIZ

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

Aprovada em 22 de novembro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Micheline Rosa Silveira - Orientador (FAFAR-UFMG)
Marcos Paulo Gomes Mol - Coorientador (Fundação Ezequiel Dias)
Raquel Sampaio Jacob (PUCMG)
Cristina Duarte Vianna Soares (UFMG)
Renes de Resende Machado (UFMG)
Carolina Paula de Souza Moreira (Fundação Ezequiel Dias)



Documento assinado eletronicamente por **Micheline Rosa Silveira, Vice diretor(a) de unidade**, em 22/11/2022, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Sampaio Jacob, Usuário Externo**, em 22/11/2022, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renes de Resende Machado, Professor do Magistério Superior**, em 22/11/2022, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Marcos Paulo Gomes Mol, Usuário Externo**, em



22/11/2022, às 12:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Duarte Vianna Soares, Subcoordenador(a)**, em 22/11/2022, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Paula de Souza Moreira, Usuário Externo**, em 22/11/2022, às 12:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1880869** e o código CRC **33F719C4**.

*Às minhas filhas Ana Luísa e Gabriella,
pedacinhos de doçura na minha vida.
Vidas que Deus me confiou para ser Mãe,
profissão da qual eu me orgulho muito.
Foguetinhos que me levantam,
me levam adiante
mesmo que o caminhar seja duro
e os caminhos incertos.
Tão belas... Sorriso e Sorrisão
me ensinam a sorrir
todo dia e a não desistir.
Trazem consigo a certeza de que
tudo vale a pena,
e que para ser feliz precisa-se de muito pouco.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho, guiar meus passos, minha mente e meu coração;

Às minhas filhas pelo amor e compreensão em meio ao turbilhão e às ausências;

À minha família pelo aprendizado e transformação de cada dia;

À minha mãe que descansa em paz... sua luta não foi em vão...levo aqui dentro as melhores lembranças que tivemos... Vejo e sinto você sorrindo para mim, sei que me admirando e cuidando de mim como sempre...

À professora Sérgio pelo aprendizado, orientação, paciência, carinho e compreensão para a consecução deste trabalho;

Ao caro e nobre pesquisador Marcos, sempre dinâmico e otimista, por todo apoio para que eu não desistisse;

À querida professora Micheline por abrir as portas da FaFar e aceitar a orientação para conclusão desse trabalho;

*Ao O Prof. Dr. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa, do Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que gentilmente cedeu a espécie de microalga *Chlorella vulgaris* para os testes e pelo incentivo para concluir o doutorado.*

Aos colegas do Laboratório de Águas da FaFar, da Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos e da Divisão de Controle de Qualidade da Funed;

Ao meu amigo Léo, à Sandra Regina e Olívia Maria Vasconcelos pelo apoio e companheirismo nessa jornada;

À banca de examinadores, aos revisores dos artigos pelas contribuições para enriquecer esta tese.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem.
Um dia a gente aprende.
Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo.
Quem acredita sempre alcança!
Mas é claro que o sol vai voltar amanhã,
mais uma vez ...
Espera que o sol já vem.*

Renato Russo

APRESENTAÇÃO

Este trabalho constitui a tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica (PPGMAF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, linha de pesquisa de Medicamentos em Populações, como requisito à obtenção do grau de Doutora em Medicamentos e Assistência Farmacêutica. É apresentado no formato de artigo conforme estabelecido no Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicamentos e Assistência Farmacêutica no seu Capítulo VIII, Art. 64, Parágrafo 1º.

Essa tese é um dos produtos do Termo de Cooperação Científica 001/2017, celebrado entre a Funed e a UFMG para a execução de estudos relacionados ao monitoramento e degradação de fármacos. A contrapartida da Funed incluiu o suporte técnico, equipamentos, padrões, matérias-primas, consumíveis, medicamentos necessários à execução dos testes e pessoal para testes e análises, envolvendo a Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento (DPD) por meio da Divisão de Plataformas Tecnológicas (DPT) e a Diretoria Industrial (DI) por meio da Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos (DDM) e Divisão de Controle de Qualidade (DCQ). O Laboratório de Água do Departamento de Farmácia Social da Faculdade de Farmácia da UFMG forneceu infraestrutura, equipamentos, materiais consumíveis, protocolos padronizados mão de obra qualificada para apoio aos testes. A pesquisa recebeu equipamentos e consumíveis adquiridos com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) por meio do processo n. CEX-APQ-01626-14. O estudo englobou iniciativas que contribuíram para o estreitamento da parceria universidade/ empresa, ampliação do conhecimento técnico-científico na área ambiental e para a saúde pública.

Este volume contém:

1. Considerações iniciais;

2. Objetivos;

3. Métodos;

4. Caracterização, doseamento e estabilidade de NVP nos meios de teste;

5. Estudo I “Os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos”;

6. Estudo II “Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do ingrediente ativo farmacêutico nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina sobre a espécie vegetal *Allium cepa*”;

7. Conclusão;

8. Considerações finais;

Referências Bibliográficas;

Apêndices.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACTG	<i>Adult Aids Clinical Trials Group</i>
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> , Ingrediente ativo Farmacêutico; IFA
ARV	Antirretroviral
AZT	Zidovudina
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> - Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C	Graus Celsius
CAI	<i>Chromosomal Aberration Index</i> ; Índice de Aberrações Cromossômicas
CE	Concentração Efetiva; <i>effective concentration</i>
CENO	Concentração em que nenhum efeito é observado; <i>No observed effect concentration</i> ; <i>NOEC</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CL	Concentração letal
CN	Controle negativo; <i>negative control</i>
CR	Crescimento radicular; <i>Root Growth</i> ; <i>RG</i>
DDM	Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	<i>Dose response curve</i>
EC	<i>effective concentration</i> ; concentração efetiva
EFV	Efavirenz
ERO	Espécie reativa ao oxigênio
F1	Região não-meristemática da radícula
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento de Minas Gerais
FBC	Fator de bioconcentração
FCR	Fator de concentração
FISPQ	Ficha de Segurança de Produtos Químicos; <i>Material Safety Data Sheet</i> ; <i>MSDS</i>

FML	Medicamento à base de nevirapina em comprimidos, <i>NVP tablet formulation</i> ou Nevirax®; <i>NVP-based drug</i>
FT	Fator de translocação
Funed	Fundação Ezequiel Dias
G	Grama
GI	<i>Germination Index</i> ; Índice de Germinação; IG
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
g.L ⁻¹ ; g/L	Grama por litro
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
I%	Percentual de Inibição
IAC	Índice de Aberrações Cromossômicas; <i>Chromosomal Aberration Index</i> ; <i>CAI</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFA	Ingrediente Ativo Farmacêutico; <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> ; <i>API</i>
IG	Índice de Germinação; <i>Germination Index</i> ; <i>GI</i>
IM	Índice Mitótico; <i>Mitotic Index</i> ; <i>MI</i>
IMT	Índice de Mutagenicidade; <i>Mutagenicity Index</i> ; <i>MTI</i>
INNTR	Inibidor Não Nucleosídeo da Transcriptase Reversa; <i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> ; <i>NNRTI</i>
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i> ; Programa Internacional de Segurança Química
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional de Normalização
IRTC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
LIMNEA	Laboratório de Ecologia Aquática, Ecotoxicologia e Limnologia
LVD	Lamivudina
ln N	Logaritmo neperiano do número de células final ou em TF
ln N ₀	Logaritmo neperiano do número de células inicial ou em T ₀

μ	Taxa de crescimento
μg	Micrograma
$\mu\text{g Kg}^{-1}$; $\mu\text{g/ Kg}$	Micrograma por quilo
$\mu\text{g L}^{-1}$; $\mu\text{g/ L}$	Micrograma por litro
μM ; μmol	Micromolar; micromol
$\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$	Micromol . metro quadrado por segundo
M ; mol L^{-1} ; mol/ L	Molar; mol por litro
mg	Miligrama
mg.g^{-1} ; mg/g	Miligrama por grama
mg.L^{-1} ; mg/L	Miligragra por litro
MI	<i>Mitotic Index</i> ; Índice Mitótico; IM
mL	Mililitro
mL/ g	Mililitro por grama
mm	Milímetro
MM	Massa molar
mm^2	Milímetro quadrado
MMS	metilmetanossulfonato; <i>methylmethanesulfonate</i>
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico
MP	Micropoluente
MSDS	<i>Material Safety Data Sheet</i> ; Ficha de Segurança de Produtos Químicos; FISPQ
MTI	<i>Mutagenicity Index</i> ; Índice de Mutagenicidade; IMT
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NC	<i>Negative control</i> ; controle negativo
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
ng L^{-1} ; ng/L	Nanograma por litro
NNTRI	<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> ; INNTR
NOEC	<i>No observed effect concentration</i> ; concentração em que nenhum efeito é observado; CENO

NVP	Nevirapina; <i>nevirapine</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde; <i>World Health Organization</i> ; <i>WHO</i>
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PERD	Parque Estadual do Rio Doce
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVHIV	Pessoas vivendo com <i>HIV</i>
RG	<i>Root Growth</i> ; Crescimento radicular; CR
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RT</i>	<i>Reverse transcriptase</i> ; Transcriptase Reversa; TR
SQR	Substância Química de Referência
T0	Tempo inicial
TARV	Terapia Antirretroviral
TF	Tempo final
TFL	Trifluralina; <i>trifluralin</i>
TR	Transcriptase Reversa; <i>Reverse transcriptase</i> ; <i>RT</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
<i>UHPLC</i>	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
USA	<i>United States of America</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial da Saúde; OMS
ZDV	Zidovudina

RESUMO

A nevirapina (NVP) é ingrediente ativo farmacêutico (IFA) usado em medicamentos para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, impedindo sua multiplicação. Atua na via de transcrição do ácido desoxirribonucleico, em humanos, inibindo a enzima transcriptase reversa. As características químicas de NVP possibilitam sua acumulação na água e nos sedimentos e, por essas razões, ela pode induzir efeitos sobre outras espécies ambientalmente expostas. A literatura relata que os efeitos tóxicos de um IFA pode se modificar quando estes estão associados aos excipientes. Nesse sentido, este estudo foi inédito ao avaliar a toxicidade do IFA e de um medicamento à base de NVP para os organismos aquáticos *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* e *Aliivibrio fischeri* e para o vegetal *Allium cepa*. A toxicidade aquática foi avaliada com base na concentração efetiva (CE) de 50% e de 10%, determinada pelo modelo dose-resposta log-logístico para dados não paramétricos. Observou-se que o crescimento de *C. vulgaris* foi inibido pelo IFA e pelo medicamento, porém suas CE50% não foram estatisticamente diferentes, sugerindo que os excipientes não interferiram na inibição de crescimento dessa espécie. Por outro lado, o IFA causou a mortalidade (imobilidade) dos náuplios de *A. salina*, porém não foi observado qualquer efeito para o medicamento. Quanto à espécie *A. fischeri*, observou-se que, na presença de excipientes, a CE50% de inibição da bioluminescência foi menor que a observada para o IFA. A toxicidade citogenética de nevirapina para o vegetal *A. cepa* foi avaliada, pela primeira vez, utilizando-se sementes como modelo. Esse modelo permitiu avaliar o índice de germinação (IG) e o índice de mutagenicidade (IMT) inéditos. Os IGs das sementes expostas às concentrações $6,42 \pm 0,58$ e $9,54 \pm 0,87$ mg/L do IFA e $11,20 \pm 1,13$ mg/L do medicamento à base de NVP foram estatisticamente maiores que o controle negativo (CN) e similares ao alquilante metilmetanossulfonato (MMS). Observou-se 10% de inibição da germinação na concentração $5,48 \pm 0,44$ mg/L do medicamento e IGs similares ao controle negativo nas demais concentrações. Em todas as concentrações do medicamento e do IFA, o CR foi estatisticamente menor que o controle negativo, exceto na concentração $6,42 \pm 0,58$ mg/L do IFA que foi similar ao CN. Na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, o índice mitótico (IM) foi estatisticamente maior que o controle negativo e similar ao MMS, indicando citotoxicidade. A aderência cromossômica foi a aberração

cromossômica mais frequente em todos os grupos expostos à NVP. Os índices de anormalidades cromossômicas (IACs) foram estatisticamente maiores que o controle negativo, sugerindo genotoxicidade para todas as concentrações testadas. Os IMTs nas três concentrações do IFA e em $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento foram estatisticamente maiores que o controle negativo, sugerindo a possibilidade de mutagenicidade. Por fim, as CE50% e os efeitos citogenéticos indicam que os resíduos de NVP são de interesse ambiental e, nesse sentido, pode-se concluir que a redução da presença deste micropoluentes é um fator importante para mitigar os possíveis danos às outras espécies. Este estudo demonstrou a possibilidade de monitorar efluentes na rotina da indústria farmacêutica e, nesse sentido contribuir para prevenção de riscos decorrentes da exposição aos resíduos de fármacos para a saúde humana e para o ambiente.

Palavras-chaves: nevirapina; toxicidade aquática; toxicidade ambiental; índice de mutagenicidade.

ABSTRACT

Nevirapine (NVP) is an active pharmaceutical ingredient (API) used in drugs for the treatment of human immunodeficiency virus infection, preventing its multiplication. It acts on the deoxyribonucleic acid transcription pathway in humans, inhibiting the reverse transcriptase enzyme. The chemical characteristics of NVP allow its accumulation in water and sediments and, for this reason, it may induce effects on other environmentally exposed species. The literature reports that the toxic effects of APIs can change when they are associated with excipients. In this sense, this study was unprecedented in assessing the toxicity of API and a drug based on NVP for the aquatic organisms *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* and *Aliivibrio fischeri* and for the plant *Allium cepa*. Aquatic toxicity was evaluated based on the effective concentration (EC) of 50% and 10%, determined by the log-logistic dose-response model for non-parametric data, in the free software R. It was observed that the growth of *C. vulgaris* was inhibited by the IFA and the drug, but their EC50% were not statistically different, suggesting that the excipients did not interfere with the growth inhibition of this species. On the other hand, IFA caused mortality (immobility) of *A. salina* nauplii, but no effect was observed for the drug. As for the *A. fischeri* species, it was observed that in the presence of excipients the EC50% of bioluminescence inhibition was lower than that observed for the API. The cytogenetic toxicity for NVP for the plant *A. cepa* was evaluated, for the first time, using the seeds as a model. This model made it possible to evaluate the unprecedented germination index (GI) and mutagenicity index (IMT). The GIs of seeds exposed to concentrations of 6.42 ± 0.58 and 9.54 ± 0.87 mg/L of API and 11.20 ± 1.13 mg/L of NVP-based medicine were statistically higher than the control negative (CN) and similar to the alkylating methylmethanesulfonate (MMS). About 10% inhibition of germination was observed at the concentration of 5.48 ± 0.44 mg/L of the drug and IGs similar to the negative control in the other concentrations. At all drug and API concentrations, the CR was statistically lower than the negative control, except for the 6.42 ± 0.58 mg/L API concentration, which was similar to the CN. At the concentration of 17.68 ± 1.29 mg/L of the NVP-based drug, the mitotic index (MI) was statistically higher than the negative control and similar to the MMS, indicating cytotoxicity. Chromosomal adherence was the most frequent chromosomal aberration in all groups exposed to NVP. The chromosomal abnormality indexes (CAIs) were statistically higher than the

negative control, suggesting genotoxicity for all tested concentrations. The IMTs in the three API concentrations and in 17.68 ± 1.29 mg/L of the drug were statistically higher than the negative control, suggesting the possibility of mutagenicity. Finally, EC50% and cytogenetic effects indicate that NVP residues are of environmental interest and, in this sense, it can be concluded that reducing the presence of this micropollutant is an important factor to mitigate possible damage to other species. This study demonstrated the possibility of monitoring effluents in the routine of the pharmaceutical industry and, in this sense, preventing risks arising from exposure to drug residues for human health and the environment.

Keywords: nevirapine; aquatic toxicity; environmental toxicity; mutagenicity index.

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
1.1 A nevirapina e suas propriedades físico-químicas e farmacológicas	25
1.2 Alguns aspectos da toxicidade ambiental da NVP	27
1.3 Excipientes e a toxicidade de medicamentos	28
1.4 Ensaio biológicos de toxicidade ambiental	30
1.4.1 Ensaio de toxicidade utilizando <i>Chlorella vulgaris</i>	33
1.4.2 Ensaio de toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	34
1.4.3 Ensaio de toxicidade utilizando <i>Aliivibrio fischeri</i>	36
1.4.4 Ensaio de toxicidade utilizando <i>Allium cepa</i>	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
2.2.1 Estudo I: “Os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos”	39
2.2.2 Estudo II: “Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para <i>Allium cepa</i> ”:	40
3 MÉTODOS	41
3.1 Determinação de NVP e sua estabilidade em diferentes meios	41
3.2 Organismos-testes	42
3.3 Substâncias testadas	42
3.4 Delineamento experimental	42
3.4.1 Teste de mortalidade de <i>A. salina</i>	43
3.4.2 Teste de inibição do crescimento de <i>C. vulgaris</i>	44
3.4.3 Teste de inibição de bioluminescência de <i>A. fischeri</i>	46
3.4.4 Teste de citogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade <i>A. cepa</i>	48

4 CARACTERIZAÇÃO, DOSEAMENTO E ESTABILIDADE DE NVP NOS MEIOS DE TESTE.....	51
5 ESTUDO I: “OS EFEITOS TÓXICOS DO ANTIRRETROVIRAL NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS”	54
5.1 Introdução	56
5.2 Metodologia.....	58
5.2.1 Substâncias químicas.....	58
5.2.2 Soluções padrão para a quantificação da NVP.....	58
5.2.3 Soluções/suspensão de NVP para testes	59
5.2.4 Meio de cultura do teste de <i>C. vulgaris</i>	59
5.2.5 Equipamentos e condições cromatográficas para determinação analítica da NVP.....	59
5.2.6 Organismos-teste	60
5.2.7 Testes de inibição de crescimento de <i>C. vulgaris</i>	60
5.2.8 Teste de mortalidade (imobilização) de <i>A. salina</i>	62
5.2.9 Teste de inibição de bioluminescência de <i>A. fischeri</i>	63
5.2.10 Análise de dados.....	64
5.3 Resultados	64
5.3.1 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para <i>C. vulgaris</i>	64
5.3.2 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para <i>A. Salina</i>	66
5.3.3 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para <i>A. fischeri</i>	67
5.4 Discussão.....	69
5.4.1 Efeitos de NVP para <i>C. vulgaris</i>	70
5.4.2 Efeitos de NVP para <i>A. salina</i>	71

5.4.3 Efeitos de NVP para <i>A. fischeri</i>	73
5.4.4 O efeito da formulação do medicamento sobre a toxicidade do IFA	74
5.4.5 Os valores de CE10% de NVP e suas implicações.....	75
5.4.6 Possíveis efeitos ambientais do IFA e do medicamento à base de NVP	75
5.5 Conclusão	77
Referências	78
6 ESTUDO II: “CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO INGREDIENTE ATIVO FARMACÊUTICO NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA SOBRE A ESPÉCIE VEGETAL <i>ALLIUM CEPA</i> ”	86
6.1 Introdução	88
6.2 Materiais e Métodos	92
6.2.1 Substâncias químicas.....	92
6.2.2 Soluções, suspensões e reagentes.....	93
6.2.3 Corantes para confecção de lâminas permanentes	93
6.2.4 Determinação analítica de NVP	94
6.2.5 Organismo-teste	94
6.2.6 Teste de germinação de sementes	94
6.2.7 Crescimento de radículas.....	95
6.2.8 Preparação de lâminas: coloração e fixação.....	95
6.2.9 Avaliação do Índice Mitótico	96
6.2.10 Avaliação das aberrações cromossômicas e alterações nucleares na região meristemática	96
6.2.11 Avaliação do Índice de Mutagenicidade	97
6.2.12 Análise dos dados	97
6.3 Resultado e discussão	97
6.4 Conclusões e considerações finais	111
Referências	112

7 CONCLUSÕES	119
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
APÊNDICES.....	146
A – Manutenção e crescimento de cultura <i>C. vulgaris</i>	146
B - Ensaio preliminares - Mortalidade (imobilidade) de náuplios de <i>A. salina</i> expostos à NVP solubilizada em DMSO 1% v/v.....	149
C - Caracterização físico-química das soluções/suspensões de nevirapina, dos excipientes e da formulação para o ensaio com <i>A. fischeri</i>	151
D – Sumarização dos resultados dos Estudos I e II da tese	152

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Entre as grandes mudanças do século passado encontra-se a revolução da abordagem terapêutica das doenças. Com a pandemia de COVID-19, ficou em evidência o desenvolvimento biotecnológico farmacêutico, ferramenta que tornou possível a introdução rápida de fármacos cada vez mais potentes e específicos e de novas formulações, em curto espaço de tempo, para conter os avanços da pandemia e melhorar a qualidade de vida e a adesão das pessoas aos tratamentos. Esse novo cenário, embora constitua um avanço e contribua para o aumento da expectativa de vida, traz consigo um aumento considerável do acesso aos tratamentos com medicamentos e o agravamento de questões, como a presença de resíduos de fármacos no ambiente, e outras ainda não enfrentadas globalmente como a detecção do vírus SARS-Cov-2 nas águas e esgotos (AUKIDY; ZAMBELLO, 2012; CASTILLO-ZACARÍAS *et al.*, 2020; KÜMMERER, 2010; SANGKHAM, 2021; TANDUKAR *et al.*, 2022; VERLICCHI; TAYLOR; SENAC, 2014; WILKINSON *et al.*, 2022). Os fármacos e as demais substâncias contidas nas suas respectivas formulações atingem o solo e as águas superficiais e subterrâneas a partir de esgotos domésticos, lixiviados de aterros sanitários e efluentes hospitalares e industriais (LI, 2014; NASCENTES *et al.*, 2019; SUAREZ; LEMA; OMIL, 2009). Nesse sentido, os fármacos constituem micropoluentes (MP) emergentes, detectados em concentrações muito baixas no ambiente, em especial no meio aquático (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; SILVA; COLLINS, 2011).

Salienta-se que a falta de estrutura hidrossanitária e a disposição inadequada de resíduos sólidos são responsáveis pela disseminação de múltiplos poluentes no meio aquático e no solo. O problema torna-se particularmente importante nos países em que apenas uma parte dos esgotos é sanitária e adequadamente tratada (BIEL-MAESO *et al.*, 2018; FURTADO; FAUSTINO, 2022; NANNOU *et al.*, 2019). Alguns compostos farmacêuticos são resistentes aos tratamentos convencionais das estações de tratamento de água para abastecimento, fato que se agrava em função da ineficiência das estações de tratamento de esgoto para remover micropoluentes farmacêuticos (ABAFE *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; MARZABAL *et al.*, 2022; NGUMBA, 2018; PRASSE *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a preocupação com os efeitos sobre outras espécies ambientalmente expostas justifica-se pelo fato de os fármacos atuarem sobre alvos biológicos humanos que, potencialmente, podem estar presentes em outras espécies (ADEOGUN *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; MARZABAL *et al.*, 2022).

Dentre os fármacos que constituem micropoluentes ambientais, destaca-se a nevirapina (NVP) que é um antirretroviral da classe dos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (INNTR), usado para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*HIV*) impedindo sua multiplicação. A NVP atua especificamente na via de transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), inibindo a enzima transcriptase reversa (TR) do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo I (*HIV-1*), não atuando contra o *HIV-2* (DE CLERCQ, 1998a).

A NVP se liga, exclusivamente, ao sítio de ligação alostérico do domínio catalítico da transcriptase reversa, muito próximo ao sítio catalítico (De CLERCQ, 1998b), alterando a conformação da enzima para a forma inativa (ESNOUF *et al.*, 1995). A transcriptase reversa, também chamada de DNA-polimerase dependente de RNA, é uma enzima encontrada em retrovírus como o *HIV* (MARTÍN-ALONSO *et al.*, 2022; SHIMADA *et al.*, 1994). Essa enzima é responsável pela polimerização do DNA a partir do ácido ribonucleico (RNA) do vírus *HIV* lançado no citoplasma da célula infectada (MUKHERJEE *et al.*, 2021). Em humanos essa função é desempenhada pelas DNA-polimerases e nas diversas espécies há enzimas similares que desempenham essa mesma função. Apesar da similaridade funcional, a NVP não parece inibir as DNA-polimerases de células eucarióticas (como as DNA-polimerases humanas a, b, c ou d) nas doses terapêuticas, indicando uma seletividade para inibição da enzima viral (DE CLERCQ, 1993). Pouco se sabe sobre efeitos em outras espécies.

Esclarece-se ainda que a nevirapina, segundo os estudos do *Adult Aids Clinical Trials Group* (AACTG) é uma opção segura, efetiva e de baixo custo para os

indivíduos adultos que apresentam contraindicação ou intolerância ao INNTR efavirenz (EFV), que possuam diabetes melito, coronariopatias ou risco cardiovascular elevado (escore de Framingham > 20%) (BRASIL, 2018). Na terapia antirretroviral (TARV) para crianças e adolescentes, a nevirapina é um dos esquemas da quimioprofilaxia do recém-nascido de mães infectadas pelo HIV, utilizado nas primeiras quarenta e oito horas de vida do bebê. É também a opção de escolha nos esquemas envolvendo INNTR em crianças menores de três anos de idade (BRASIL, 2018; CRESSEY *et al.*, 2017; PENTA HIV, 2019).

Além do exposto, NVP é um fármaco utilizado por cerca de trinta e cinco por cento da população mundial, especialmente em países de baixa renda onde tem sido uma das opções terapêuticas disponíveis a baixo custo (THE TENORES STUDY GROUP, 2015).

Entretanto, as características físico-químicas (baixa solubilidade em água, alta lipofilicidade, alta estabilidade química) e baixa biodegradabilidade ambiental (KIM *et al.* 2019) favorecem uma possível acumulação no ambiente. Isso se torna relevante quando essas características se associam ao mecanismo de ação de NVP e ao fato de que a sua molécula possui a estrutura química dipiridil, comum a alguns herbicidas e que funciona como aceptor de elétrons responsável pela produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (ROEDE; MILLER, 2014), podendo induzir o metabolismo oxidativo, levando à injúria tecidual e morte celular (GUO *et al.*, 2020). O carreamento contínuo desses resíduos no solo e nos sedimentos pode acarretar efeitos agudos e/ou crônicos que podem ou não ser reversíveis.

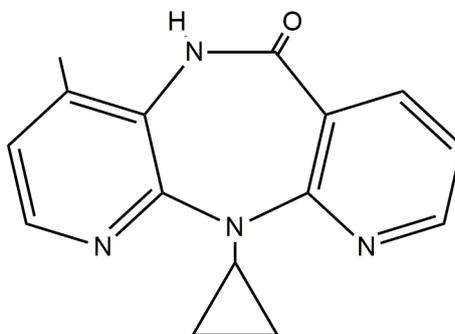
Considerando o exposto, estudar a toxicidade ambiental de fármacos é importante para o conhecimento dos efeitos desses micropoluentes para outras espécies e nesse sentido, contribuir para o dimensionamento do risco decorrente da produção industrial e do consumo humano de medicamentos. Por fim, tem-se como objetivo geral nessa tese, avaliar o potencial tóxico do ingrediente ativo NVP isolado e em um medicamento à base de NVP para as espécies aquáticas *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* e *Aliivibrio fischeri* e para a espécie vegetal *Allium cepa*.

O ineditismo deste estudo consistiu da comparação da toxicidade aquática entre o IFA nevirapina e um medicamento à base de NVP para as espécies *C. vulgaris*, *A. salina* e *A. fischeri*, além da toxicidade citogenética para *A. cepa*. Utilizou, pela primeira vez, o modelo em sementes de *A. cepa* para estudar os efeitos de NVP, o que permitiu a inclusão da germinação como mais um parâmetro de avaliação de sua citotoxicidade. O estudo possibilitou a complementação dos dados de citotoxicidade e de genotoxicidade de NVP disponíveis na literatura, incluindo-se a avaliação da mutagenicidade da região não merismática F1 para o IFA e para o medicamento.

1.1 A nevirapina e suas propriedades físico-químicas e farmacológicas

A NVP é o fármaco antirretroviral, introduzido na terapêutica no final da década de 90 (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química da nevirapina



Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (adaptado).

A nevirapina é uma base nitrogenada fraca que pode se apresentar polimorfa na forma anidra, hemidratada ou solvatada. Nesse estudo foi utilizada a nevirapina anidra, um pó branco pouco solúvel em água (90 mg/L). A presença dos grupos arila confere alta lipofilicidade à molécula devido ao efeito eletrorretirador, o que realça a acidez do próton do grupo amida (pK_a 2,8), facilitando sua solubilização em meio ácido. O coeficiente de partição octanol/água (LogP) é 2,5 (BOEHRINGER INGELHEIM, 2015; KIM *et al.*, 2019).

Farmacologicamente, a NVP é um inibidor não análogo de nucleosídeo da transcriptase reversa do *HIV-1* que age bloqueando as atividades das DNA polimerases, DNA-dependentes e RNA-dependentes. Seu mecanismo de ação difere dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos/nucleotídeos porque não requer a conversão intracelular a metabólitos trifosfatados para incorporação ao DNA viral (MARTÍN-ALONSO *et al.*, 2022). A ligação da NVP na cavidade assimétrica e hidrofóbica, muito próxima ao sítio catalítico da enzima viral, restringe a flexibilidade e mobilidade de domínios enzimáticos que participam da síntese de DNA viral, o que reduz a eficiência da enzima transcriptase reversa viral (MUKHERJEE *et al.*, 2021; SRIRAM; YOGEE SWARI; KISHORE, 2006).

A lipossolubilidade da NVP facilita sua penetração nas células, permite altos níveis plasmáticos no sistema nervoso central e facilita a transposição da barreira placentária (VIRAMUNE, 2019).

A NVP é metabolizada pela via oxidativa do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP2B6) no fígado humano, produzindo vários metabólitos, entre os quais, as hidroxinevirapinas (posições 2, 3, 8 ou 12) que podem dar origem aos respectivos glucuronídeos. O metabólito 12-hidroxinevirapina, além de dar origem ao 12-hidroxinevirapina glucuronídeo, pode originar a 4-carboxinevirapina por ação da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial. Além da parte não absorvida, cerca de 5% da NVP é excretada na forma inalterada por via urinária, juntamente com os demais metabólitos glucuronados, porém a toxicidade de seus metabólitos não é conhecida (KIM *et al.*, 2019).

Esse fármaco é considerado tratamento de primeira escolha na prevenção da transmissão vertical (mãe para filho) do *HIV* e no tratamento contra *HIV* em recém-nascidos pela Organização Mundial de Saúde - (OMS) (*WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO*, 2019).

No Brasil, a NVP é amplamente utilizada por gestantes e recém-nascidos seguindo as diretrizes da OMS, sendo seu uso consolidado no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Manejo da Infecção pelo *HIV* em Crianças e Adolescentes 2018 (BRASIL, 2018).

1.2 Alguns aspectos da toxicidade ambiental da NVP

A NVP tem sido detectada em águas superficiais na Europa (PRASSE, 2010) e na África do Sul (SCHOEMAN; DLAMINI; OKONKWO, 2017; WALENGAB; NOMNGONGO, 2022; WOOD; DUVENAGE; ROHWER, 2015) e na bacia do Rio Nairobi no Kenia (ARTIKKELI *et al.*, 2015; NGUMBA, 2018). NVP não sofre degradação pela cloração da água (WOOD, 2016). Foi demonstrado por alguns estudos que a eficiência para a remoção de NVP por estações de tratamento convencionais foi menor que 60%, não sendo possível a remoção completa deste micropolvente (NGUMBA, 2018; PRASSE, 2010; PRASSE *et al.*, 2015;).

Segundo critérios da *International Agency of Research on Cancer – IRTC*, a NVP não está enquadrada como carcinógeno humano. Na avaliação da mutação genética pelo teste de Ames em *Salmonella* e em *Escherichia coli*, não foi demonstrada atividade mutagênica ou clastogênica (BOEHRINGER INGELHEIM, 2015). Em ensaios de mutação de genes em células de mamíferos (ovário de hamster chinês – células CHO/ HGPRT), ensaios de micronúcleo de medula óssea de camundongo também não foram detectados efeitos mutagênicos de NVP (BOEHRINGER INGELHEIM, 2015).

Em termos ambientais, em estudos da indústria farmacêutica Boehringer Ingelheim (2015) foi demonstrado que para o microcrustáceo *Daphia magna*, a concentração efetiva (CE) de 50% (CE50%) sobre a mortalidade (imobilidade) foi maior que 76,9 mg/L, após 48 horas de exposição à NVP. A concentração inibitória de 50% do crescimento (CE50%) para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi maior que 43 mg/L.

Onwuamah e colaboradores (2014) realizaram ensaios com raízes de bulbo de *A. cepa* para comparar a toxicidade citogenética entre os antirretrovirais zidovudina (ZDV) e NVP. Esses autores utilizaram uma formulação em xarope contendo NVP e no ensaio de citotoxicidade observaram que a inibição de 50% (CE50%) do crescimento das raízes de *A. cepa* após 96 horas ocorreu na concentração de 92,5 μM (equivalente a 24,63 mg/L) para NVP e de 65,0 μM (equivalente a 17,37 mg/L) para ZDV.

No estudo de Akenga e colaboradores (2021), foi avaliado o efeito da contaminação por antivirais e antirretrovirais, dentre eles a NVP, em agrossistemas utilizando a alface hidropônica. No estudo foi calculado o fator de concentração na raiz (FCR) e o fator de bioconcentração (FBC) para NVP que foram, respectivamente, 0,08 e 0,025 mg/g, isto é, valores menores que os observados para o INNTR efavirenz (EFV). O fator de translocação (FT) entre a raiz e a folha para a NVP foi maior que 1, indicando que, dentro da planta, ela tem a tendência de ser transportada para as folhas e não se acumular nas raízes.

1.3 Excipientes e a toxicidade de medicamentos

Na indústria farmacêutica, os excipientes são adjuvantes farmacotécnicos usados para a regulação das características biofarmacêuticas do fármaco. O conjunto de excipientes que compõe o medicamento permite a produção de formas farmacêuticas sólidas orais com o perfil farmacocinético desejado (PESSANHA *et al.*, 2012; VAN DER MERWE *et al.*, 2020).

Na Figura 2 são apresentadas, em linhas gerais, a função, as propriedades físicas e os dados de toxicidade disponibilizados pelo fabricante para os excipientes do medicamento à base de NVP comuns à maioria das formulações de medicamentos em comprimidos e que foram utilizados neste trabalho.

Figura 2 Excipientes da formulação de comprimidos de NVP: descrição qualitativa, função e propriedades físicas e toxicidade

Excipiente Fórmula molecular Massa Molar (MM)	Função	Característica de solubilidade	Densidade aparente (g/cm ³)	Toxicidade ^(a)
Glicolato amido sódico (C ₆ H ₇ O ₂ (OH) ₂ OCH ₂ COONa n) MM 240,80 g.mol ⁻¹	Desintegrante	Dispersível em água	Não disponível	Não tóxico para mamíferos e nem para o ambiente
Celulose microcristalina MC 102 ((C ₆ H ₁₀ O ₅) _n), n mínimo de 200.	Diluyente, aglutinante e desintegrante.	Insolúvel em água e pouco solúvel em álcalis	1,5 (20 °C)	Não tóxico para mamíferos e nem para o ambiente.
Lactose s <i>spray dried</i> C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ .H ₂ O MM 360,31 g.mol ⁻¹	Diluyente auxiliar de compressão	161g.L ⁻¹ em água	Não disponível	Não se prevê qualquer potencial para bioacumulação
Povidona (PVP) K30 (C ₆ H ₉ NO) _n)	viscosante e aglutinante	Solúvel em água fria, álcoois, aminas hidroclorocarbonetos	1,23	Não foram encontrados dados sobre a toxicidade ambiental ⁶³ .
Dióxido de silício coloidal (SiO ₂) MM 60,08 g.mol ⁻¹	Viscosante e aglutinante	Insolúvel em água a 20°C	0,981	Inerte em termos fisiológicos. Dados de toxicidade ambiental, não disponíveis.
Estearato de magnésio C ₃₆ H ₇₀ MgO ₄ MM 591,27 g.mol ⁻¹	Lubrificante	0.003 g/100 mL de água a 15°C e em éter; 0,020 g/100 mL de álcool a 25°C	1,028	Inerte. Toxicidade ambiental não descrita. Dados de toxicidade em mamíferos não disponíveis.

Nota: (a) A toxicidade foi informada com base no *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (UNITED NATIONS, 2021)*

Fonte: Fichas de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) ou *Material Safety Data Sheet (MSDS)*

Excipientes são substâncias químicas inertes do ponto de vista farmacológico para humanos. Os efeitos dessas substâncias no ambiente, em geral, não são bem compreendidos (WANG *et al.*, 2021; WIRTZ; STUDER; STRAUB, 2015). Em alguns estudos tem sido demonstrado que as formulações apresentam toxicidades diferentes do IFA isolado para alguns organismos aquáticos, o que tem sido atribuído à presença dos excipientes. Além de efeitos tóxicos diretos, interações de excipientes com o próprio IFA podem ser responsáveis por modificação na absorção do fármaco por organismos aquáticos (JACOB *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2014).

Os excipientes são utilizados na preparação da maioria das formas sólidas de medicamentos e muitas vezes, podem representar a maior parte de uma formulação. Existem poucas substâncias com características adequadas para constituir um excipiente, ou seja, que sejam inertes e capazes de permitir a aglutinação, compressão e rápida desagregação no trato gastrointestinal, fazendo com que as mesmas substâncias sejam utilizadas para preparação dos diversos medicamentos (WIRTZ; STUDER; STRAUB, 2015).

Alguns excipientes não são absorvidos, enquanto outros o são, em ambos os casos, pode-se supor que alguns excipientes estejam presentes nos esgotos em grande concentração. Além disso, alguns excipientes são amplamente utilizados em outros produtos como alimentos, tintas, pesticidas, cosméticos e itens de higiene pessoal (WIRTZ, STUDER; STRAUB, 2015).

Esclarece-se que a maioria dos estudos de toxicidade ambiental está dirigida somente aos ingredientes ativos farmacêuticos e suas combinações (HEATH *et al.*, 2016; RICO *et al.*, 2021; TOOLARAM; KÜMMERER; SCHNEIDER, 2014; WILKINSON *et al.*, 2022), desconsiderando o fato de que os medicamentos sejam constituídos de uma mistura de substâncias e que, no ambiente, a presença de excipientes pode desencadear efeitos diretos e indiretos, responsáveis pelo fato de que para algumas espécies aquáticas a formulação pode apresentar CE50% diferente do IFA isolado (JACOB *et al.*, 2016; PAVLAKI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014). Essa variação foi observada em estudos de toxicidade ambiental com a espécie *A. fischeri*, demonstrando que os excipientes podem alterar o efeito observado para o fármaco de tal forma que formulações diferentes de um mesmo IFA podem apresentar efeitos tóxicos diferentes para a espécie, contribuindo para o impacto ambiental dos medicamentos (JACOB *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2014).

1.4 Ensaios biológicos de toxicidade ambiental

A sensibilidade dos organismos aos xenobióticos é variável e depende de suas características genéticas e metabólicas (GRINTEN *et al.*, 2010). Do mesmo modo,

as respostas biológicas das diversas espécies estão associadas à concentração e às propriedades do agente de exposição. Não existe um organismo único que permita avaliar toda a diversidade dos efeitos de um xenobiótico e não é possível simular, em escala laboratorial, todas as diferentes condições bióticas e abióticas a que estão sujeitos os ecossistemas e que podem interferir na resposta das espécies aos agentes tóxicos. Deste modo, os órgãos reguladores recomendam a utilização de pelo menos três representantes da biota não só aquática para avaliação da toxicidade ambiental para cada ecossistema. Os organismos mais utilizados são os produtores primários (algas e cianobactérias), consumidores primários (microcrustáceos), consumidores secundários (peixes) e decompositores (bactérias) (OECD, 2011).

O efeito no organismo-teste exposto ao xenobiótico pode se diferenciar quanto ao desfecho (morte, imobilidade, fuga, taxa de crescimento, seleção de gênero, maturação sexual ou respostas específicas como a genotoxicidade) e quanto à duração em relação ao ciclo de vida do organismo teste (agudos ou crônicos) (COSTA *et al.*, 2008; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

As limitações dos ensaios de toxicidade aquática são, entre outras, a dificuldade de se reproduzir as condições naturais e de se definir as concentrações reais de exposição para substâncias uma vez que essas são testadas isoladamente, enquanto no ambiente, encontram-se junto a múltiplos poluentes. Além disso, nas condições naturais, as substâncias-teste podem interagir com outros componentes do meio, além de sofrerem degradação ou adsorção (WEYMAN *et al.*, 2012).

Ainda aponta-se que a qualidade, interpretação e validade dos resultados dos estudos de toxicidade aquática dependem do organismo-teste utilizado. A sensibilidade ao contaminante, alta disponibilidade no ambiente, genética estável e uniforme, boa representatividade de seu nível trófico, facilidade de cultivo, reprodução e manejo laboratorial são características fundamentais para que a espécie possa constituir um modelo de estudo. Por outro lado, a adequada padronização das condições do teste com o controle das condições experimentais

como a luminosidade, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e salinidade são fundamentais para a confiabilidade e reprodutividade dos resultados (TOOLARAM; KÜMMERER; SCHNEIDER, 2014). Além disso, as propriedades da substância investigada também devem ser conhecidas e compatíveis com as condições experimentais, principalmente sua solubilidade, para garantir sua disponibilidade no meio, o tamanho molecular, pureza, fotoestabilidade, estabilidade química, absorção de luz, pKa, coeficiente de partição óleo/água e pressão de vapor (UNITED NATIONS, 2021; WEYMAN *et al.*, 2012). Assim, o uso do modelo adequado às características da substância-teste e o controle das condições do ensaio são essenciais para a confiabilidade dos resultados.

Soma-se o fato de que a concentração limite para toxicidade é uma questão de difícil definição. De acordo com a *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals – GHS* (UNITED NATIONS, 2021) amostras com toxicidade aquática em concentrações inferiores a 100 mg/L são consideradas de interesse ambiental em função dos riscos potenciais para microalgas e microcrustáceos. Por outro lado, isso pode variar para outros modelos e o conjunto dos resultados é usado para a definição das concentrações máximas que representam risco para o ecossistema aquático. De acordo com a *GHS*, o termo “nenhuma toxicidade aguda” aplica-se às substâncias com CE50% ou concentrações letais (CL50%) acima de sua solubilidade em água ou com solubilidade em água menor que 1 mg/L e ainda quando existirem evidências de que a toxicidade aguda não fornece valores reais de toxicidade intrínseca (UNITED NATIONS, 2021).

A classificação de substâncias quanto à toxicidade para o ambiente aquático considera, além da concentração da substância testada, o tempo de exposição, o fator de bioconcentração e o tempo de degradação no ambiente (UNITED NATIONS, 2021).

De qualquer modo, os estudos admitem avaliação de diversas espécies dentro dos respectivos grupos tróficos, desde que atendam aos critérios para constituir um

organismo-teste e que as condições do ensaio sejam controladas e adequadas à avaliação da substância química a ser avaliada (COSTA *et al.*, 2008).

1.4.1 Ensaio de toxicidade utilizando *Chlorella vulgaris*

As microalgas são produtores primários, fotossintetizantes, essenciais à fixação de carbono com ampla distribuição geográfica, desde regiões polares a tropicais, dominando a produção planctônica em lagoas, rios, oceanos, rochas e solos (WHITTON *et al.*, 2011).

A suscetibilidade desses organismos aos poluentes pode resultar no desequilíbrio de todo o ecossistema aquático, afetar os estratos superiores da cadeia trófica, propiciar a dominância de espécies de microalgas mais resistentes, reduzir a diversidade dentro da comunidade fitoplanctônica (PAERL; PAUL, 2012).

Uma das vantagens de se utilizar esses organismos em testes de toxicidade é que seu ciclo de vida é relativamente curto, permitindo a observação de efeitos tóxicos agudos e/ou crônicos (COSTA *et al.*, 2008).

A toxicidade para essas espécies pode ser expressa, entre outras formas, como a concentração da substância testada que inibe o crescimento da cultura em 50% (CE50%). A CE50% é obtida a partir da curva dose resposta do percentual de inibição do crescimento da cultura em função do aumento da concentração (OECD, 2011).

A microalga *C. vulgaris*^a é um organismo da base da cadeia trófica, eucarionte, fotossintetizante, fixadora de carbono, que possui organização celular com estruturas especializadas para os processos de fotossíntese e respiração (CORDEIRO, 2015; LEA-SMITH *et al.*, 2016; MULLINEAUX, 2014; ZHANG *et al.*, 2007). Ela mede cerca de 3 a 8 µm, possui parede celular, cloroplastos (com dupla

^a *Chlorella vulgaris* pertence ao reino *Plantae*, ao filo *Chlorophyta*, classe das *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorellales*; família das *Chlorellaceae*; gênero *Chlorella*.

membrana e tilacóides empilhadas), mitocôndrias com cristas achatadas, produz clorofilas a e b, carotenóides, xantofila e luteína (SAFI *et al.*, 2014).

Os estudos com microalgas têm visado avaliar o potencial de toxicidade aguda e crônica de amostras para o ambiente aquático (BORECKA *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2020; FURTADO; FAUSTINO, 2022; GEIGER; HORNEK-GAUSTERER; SAÇAN, 2016; LATAŁA *et al.*, 2009; NIE *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2014; XI *et al.*, 2019) e biomonitoramento (CZAPLICKA; LODOWSKA, 2014; HASSAN *et al.*, 2019; SOLOVCHENKO *et al.*, 2022).

1.4.2 Ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina*

O microcrustáceo *A. salina*^b é um organismo cosmopolita que mede cerca de 8 a 12 mm, que se reproduz por partenogênese, suporta variações de temperatura entre 6°C e 35°C e é capaz de sobreviver em ambientes aquáticos com altas concentrações salinas (5 g/L a 250 g/L), mantendo sua homeostase osmótica em função da presença de Na⁺/K⁺ ATPase em órgãos especializados que expõem sal da hemolinfa isosmótica interna para o meio externo (NTUNGWE *et al.*, 2020; NUNES *et al.*, 2006). A utilização dessa espécie em testes de toxicidade aguda justifica-se por dispensar o uso de animais nos experimentos, pela facilidade de obtenção de cistos, cultivo e manuseio e rapidez, viabilidade e baixo custo de execução, sem requerer procedimentos assépticos (MARTINS *et al.*; 2021; NUNES *et al.*, 2006; PERSOONE; WELLS, 1987; RAJABI *et al.*, 2015).

A locomoção é fundamental para a sobrevivência de *A. salina* uma vez que as brânquias ciliadas funcionam não só para a captação de oxigênio do meio aquático, mas também para a filtração de alimentos como algas, bactérias e detritos. Essa espécie não compete com outros animais do zooplâncton, pois a base de sua alimentação provém de bactérias, de algas unicelulares, pequenos protozoários e de

^b Segundo a descrição de *Linnaeus* (1758), o organismo pertence filo dos *Arthropoda* (possui um ocelo, patas articuladas na forma de nadadeiras ciliadas, antenas, são rosados, marrons a esverdeados), subfilo *Crustacea*, classe *Branchiopoda*, ordem *Anostraca* (sem carapaça), família *Artemiidae* e gênero *Artemia*.

materiais particulados dissolvidos no meio. Constituem um elo trófico entre os organismos planctônicos e os níveis superiores. Podem atuar como vetores da bioacumulação de contaminantes ambientais, uma vez que aumentam o risco do fenômeno de biomagnificação em peixes e outros organismos da cadeia trófica que utilizam *A. salina* como base alimentar (NUNES *et al.*, 2006).

A toxicidade de diferentes concentrações de uma dada substância para *A. salina* é observada, visualmente, pela mortalidade (imobilidade por 10 segundos) dos náuplios determinando-se, entre outros, a CE50% durante o tempo de exposição do teste de 24 ou 48 h (COSTA *et al.*, 2008; LIBRALATO *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2006; VENKATESWARA *et al.*, 2007). Alterações na mobilidade, morfologia (VENKATESWARA *et al.*, 2007), fototaxia negativa (LIBRALATO *et al.*, 2016; VENKATESWARA *et al.*, 2007) e seleção de gênero (NUNES *et al.*, 2006) são indicativos que perturbações no ambiente estejam afetando o organismo em concentrações subletais.

Apesar de sujeito a críticas por serem organismos marinhos e resistentes a altas concentrações salinas e apresentarem variação do tipo de efeito observado (NUNES *et al.*, 2006), os ensaios com *A. salina* permanecem sendo largamente utilizados nos estudos de toxicidade ambiental (DIAZ-SOSA *et al.*, 2020; GAMBARDELLA *et al.*, 2014; LIBRALATO *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2021; MESARIĆ *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2015), para a triagem de toxicidade de extratos de plantas medicinais (BRAGUINI *et al.*, 2019; RAJABI *et al.*, 2015; YADAV; MOHITE, 2020) e compostos bioativos (TURAN; MAMMADOV, 2021). Rajabi e colaboradores (2015) estudaram a citotoxicidade de nanopartículas comparando o teste de toxicidade de *A. salina* com técnica MTT^c (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e concluíram que as CE50% calculadas pelos dois métodos não apresentaram diferença estatística significativa, demonstrando que ambos podem ser utilizados para avaliação da toxicidade, no

^c A técnica avalia indiretamente o número de células viáveis pela atividade metabólica das enzimas celulares oxidoredutase NAD(P)H dependentes no soro bovino. A capacidade de redução das enzimas celulares é diretamente proporcional ao consumo de MTT (amarelo) e formação de do produto formazan (insolúvel e púrpura). Quanto maior a intensidade da cor púrpura maior a quantidade de células viáveis presentes.

caso de nanopartículas. Alguns estudos demonstraram correlação positiva entre os testes de toxicidade aguda utilizando *A. salina* de toxicidade aguda oral em ratos (AYUKO *et al.*, 2009; HAMIDI *et al.*, 2014; LAGARTO *et al.*, 2001; NTUNGWE *et al.*, 2020; OLARU *et al.*; 2015; SASIDHARAN *et al.*, 2010).

1.4.3 Ensaio de toxicidade utilizando *Aliivibrio fischeri*

A bactéria *A. fischeri* é uma espécie marinha, naturalmente bioluminescente, não patogênica, gram negativa, de vida livre ou mutualista com lulas e peixes. A bioluminescência é consequência da expressão do gene *lux operon* que codifica subunidades da luciferase (luxAB). Na presença de oxigênio, ocorre a oxidação da riboflavina 5- fosfato (FMNH₂) e de um aldeído de cadeia longa RCHO por ação da enzima luciferase (flavina monoxigenase), originando a flavina reduzida (FMN), água e o ácido graxo (RCOOH) correspondente. Essa reação libera energia luminosa (cerca de 60 kcal/mol) e pode ser detectada no comprimento de onda máximo de 475 nm (MEDVEDEVA *et al.*, 2009; NUNES-HALLDORSON; DURAN, 2003).

A bactéria *A. fischeri* tem sido utilizada como biossensor em estudos de toxicidade de fármacos (DI NICA, VILLA; FINIZIO, 2016; DRZYMAŁA; KALKA, 2020; JACOB *et al.*, 2016; SRAIN; BEAZLEY; WLAKE, 2020) de efluentes (BARRETO, 1995; JERÔNIMO *et al.*, 2019), de metais pesados (ISHAQUE *et al.*, 2006) e para monitoramento de bacias hidrográficas (WLODKOWIC; KARPIŃSKI, 2021). Os testes são rápidos e baseiam-se na propriedade de xenobióticos de afetarem o metabolismo ou comprometerem a viabilidade bacteriana, refletindo na alteração da emissão de luminescência. O efeito observado é proporcional à concentração e à toxicidade da substância-teste. Os resultados são expressos como valores de concentração (CE50%) em que há uma redução de 50% na emissão bioluminescência (ANBT, 2006; COSTA *et al.*, 2008; YOUNG; BUTLER; JOHNSON, 1991). A automatização dos testes acoplados a softwares estatísticos facilita o biomonitoramento (WLODKOWIC; KARPIŃSKI, 2021).

1.4.4 Ensaio de toxicidade utilizando *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* (FISKEJÖ, 1993; 1994) corresponde à cebola, um vegetal monocotilédone, pertencente à família *Liliaceae* (*Amaryllidaceae*) que permite estudar a citotoxicidade de substâncias, as alterações morfológicas e ação sobre o crescimento das radículas e a genotoxicidade. Os primeiros baseiam-se na germinação e nas primeiras etapas de desenvolvimento da planta pós-germinação. Admite-se que alterações nesses processos possam ser decorrentes de danos ao material genético, inviabilizando ou alterando essas etapas. Os testes de genotoxicidade utilizando *A. cepa* apresentam boa correlação com os efeitos diretos sobre as células humanas (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012; LEME; MARIN-MORALES, 2009) e oferecem vantagens sobre outros testes pela facilidade de manuseio, cultivo durante todo o ano, germinação rápida (48 horas) e proliferação rápida com crescimento de radículas. O número reduzido de cromossomos ($2n=16$) e seu tamanho facilitam a observação microscópica das etapas da divisão celular e a pesquisa de aberrações cromossômicas e de efeitos mutagênicos.

A avaliação da integridade do processo proliferativo pode ser acompanhada em cortes histológicos nas células meristemáticas de raízes (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012) e contagem de células em cada fase da mitose, comparativamente com os grupos controle negativo (não exposto ao agente tóxico) e controles positivos. Para uma avaliação mais aprofundada sobre os efeitos genotóxicos são utilizados como controles positivos a trifluralina (TFL) (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009) e o agente alquilante metilssulfonato de metila (MMS) que permitem avaliar a adequação das respostas do sistema e comparar as substâncias quanto à atividade aneugênica (age diretamente nas etapas da divisão celular) como a TFL e clastogênica (age diretamente no DNA) como o MMS (CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

A genotoxicidade é avaliada comparando-se o índice mitótico (número de células em cada uma das etapas da divisão celular) na região meristemática dos cortes

histológicos de radículas dos grupos controle negativo e positivo expostos à TFL com os grupos expostos ao agente tóxico. A pesquisa de aberrações como a presença de células binucleadas, polinucleadas, poliploidias, atrasos, pontes e perdas de cromossômicos são indicativos de atividade aneugênica (FERNANDES; PIZANO; MARIN-MORALES, 2013). A avaliação da mutagenicidade ocorre na região F1 dos cortes histológicos de radículas, observando-se aberrações como quebras de cromossomas e a presença de micronúcleos.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* foi validado pelo *International Programme on Chemical Safety* (IPCS) da Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012). A avaliação de efeitos sobre essa espécie oferece diferentes respostas de importância ambiental como a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade na avaliação de poluentes ambientais em plantas (CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

O ensaio com *A. cepa* é consolidado na literatura para avaliação da genotoxicidade de compostos químicos (BONCIU *et al.*, 2018; PARVAN *et al.*, 2020), de plantas medicinais (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; CAMPAROTO *et al.*, 2002; CARMO; LEAL; RIBEIRO, 2020; DOS REIS *et al.*, 2020; GUEDES *et al.*, 2018; KNOLL *et al.*, 2006; NEVES; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020) e fármacos (GRISOLIA; TAKAHASHI, 1990; RAJI; ONWUAMAH; ODEIGAH, 2018), apresentando sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas, como por exemplo, com mamíferos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse modelo tem sido amplamente utilizado para monitoramento de bacias (RODRIGUES; DALZUCHIO; GEHLEN, 2016), de poluentes ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; LEME; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; SOODAN; KATNORIA; NAGPAL, 2014) e efluentes industriais (ABU; MBA, 2011; ALVIM *et al.*, 2011; DUTTA; AHMAD; SINGH, 2018; DUTTA; MALA, 2015; LEME; MARIN-MORALES, 2008; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

O presente estudo buscou testar as seguintes hipóteses:

I - A nevirapina apresenta toxicidade para os organismos aquáticos e vegetal estudados.

II – O efeito observado para o ingrediente ativo farmacêutico NVP sobre as espécies estudadas modifica na presença de excipientes de um medicamento à base de NVP.

Para a verificação dessas hipóteses foram traçados os objetivos geral e específicos a seguir.

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial tóxico do ingrediente ativo farmacêutico NVP e de um medicamento à base de NVP para o meio ambiente.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudo I: “Os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos”

- Avaliar os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos microalga *Chlorella vulgaris*, microcrustáceo *Artemia salina* e a bactéria *Aliivibrio fischeri*.
- Quantificar os efeitos adversos do medicamento à base de NVP utilizando os mesmos ensaios de toxicidade propostos para o IFA para avaliar possíveis efeitos dos excipientes.

2.2.2 *Estudo II: “Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para Allium cepa”*:

- Investigar e discutir o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da NVP e do medicamento à base de NVP, utilizando como modelo experimental a espécie *Allium cepa*.

3 MÉTODOS

3.1 Determinação de NVP e sua estabilidade em diferentes meios

O método analítico validado pela Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos foi utilizado determinar a concentração analítica de NVP nas amostras contendo o IFA nos ensaios com os organismos-teste.

Alíquotas das soluções/ suspensões teste de NVP filtradas em membrana de PVDF 0,45 μm (Millex) para vial e realizados os testes para caracterização (aspecto, cor, turbidez e pH). O doseamento foi realizado em cromatógrafo à líquido de ultra eficiência (UHPLC) com detector de DAD Shimadzu Nexra Prominence, coluna Shim Pack XR C18, dimensões 100 mm x 2,0 cm 2,2 μm , fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, fase móvel gradiente água e acetonitrila (98:2) com sistema ajustado para as condições de temperatura do forno da coluna 30 \pm 1 °C, do auto injetor 15 \pm 1°C, volume de injeção automática de 3 μL , comprimento de onda de detecção de 214 nm, varredura espectral de 190 nm a 800 nm, tempo de corrida por injeção de 20 minutos. O diluente das amostras foi acetonitrila grau cromatográfico e água purificada Tipo I (1° balão) e água purificada Tipo I (2° balão) e a solução de limpeza do autoinjetor acetonitrila (grau cromatográfico) na proporção água purificada Tipo I (2:98).

As soluções/ suspensões foram caracterizadas determinando-se o pH (pHmetro portátil WTW), o percentual de oxigênio (% O₂) dissolvido (sonda portátil Instrutherm - MO-900), a salinidade (g/L) a 15° C (condutivímetro portátil WTW modelo LF340) e turbidez (NTu) (turbidímetro portátil Turbiquant 1100 IR). Esses parâmetros foram monitorados em todos os ensaios no tempo inicial e no tempo final.

A estabilidade das soluções preparadas foi avaliada utilizando o mesmo método analítico para a determinação de NVP. Uma alíquota de 2 mL de cada solução foi filtrada em membrana de PVDF 0,45 μm (Millex) para *vial* e submetida aos ensaios de caracterização (aspecto, cor, turbidez e pH) e doseamento.

3.2 Organismos-testes

- Cultura de *Chlorella vulgaris* isolada do Parque Estadual do Rio Doce - PERD e fornecidas pelo Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG;
- Ovos de *Artemia salina* de alta eclosão - marca Maramar;
- A biomassa liofilizada de *Aliivibrio fischeri* (NRRL B-11177) - marca Biolux®;
- Sementes de *Allium cepa* (cebola baia periforme) - marca ISLA PAK.

3.3 Substâncias testadas

- Fármaco ou IFA: nevirapina anidra - lote C5028-12009M - fabricante Zhejiang. Huahai Pharmaceutical CO. LTD;
- Medicamento (FML) à base de nevirapina: medicamento similar Nevirax® lote 14030011, produzido pela FUNED, contendo nevirapina 200 mg/ comprimido e peso médio de 800 mg.

3.4 Delineamento experimental

Foram realizados diversos experimentos preliminares visando escolher as faixas de concentração a serem testadas nos organismos-testes. Neste sentido, o ensaio de *A. salina* foi o primeiro a ser realizado com base na toxicidade de NVP disponível na literatura. Os primeiros resultados foram obtidos utilizando-se solvente orgânico nos limites permitidos em testes ecotoxicológicos devido à baixa solubilidade de NVP. A concentração que provocou o efeito observado de cinquenta por cento (CE50%) dos náuplios estava dentro da faixa de solubilidade do IFA no meio de teste. Ao reproduzir o ensaio em meio aquoso sem utilização do solvente, percebeu-se a influência do solvente nos resultados, reduzindo a CE50% sobre a mortalidade (imobilidade) dos náuplios de *A. salina*. Dessa maneira, os testes posteriores foram desenvolvidos sem a utilização de solventes orgânicos, o que limitou as concentrações testadas àquelas em que foi possível obter a solubilidade da

nevirapina isolada e do medicamento à base de NVP nos meios testados para que fosse possível a comparação de resultados. Com base nos resultados obtidos para *A. salina*, foram avaliadas a microalga *C. vulgaris* e a bactéria *A. fischeri*.

Os ensaios visaram comparar os efeitos observados para o IFA isolado e aqueles observados para o medicamento à base de NVP, portanto foram necessárias que as concentrações testadas fossem aproximadas e, sempre que possível, os ensaios do IFA e do medicamento fossem realizados concomitantemente, evitando possíveis vieses relativos aos equipamentos e condições de teste. Nesse sentido, as diferenças entre os efeitos observados poderiam ser atribuídas aos excipientes do medicamento. A presença de excipientes insolúveis foi um dos obstáculos para os ensaios do medicamento em meios aquosos.

Para a espécie vegetal *A. cepa*, os ensaios preliminares foram conduzidos com base na concentração citotóxica em raízes de bulbos de cebola conforme Onwuamah e colaboradores (2014).

3.4.1 Teste de mortalidade de *A. salina*

O método utilizado foi adaptado de Meyer *et al.* (1982). As fases do teste sintetizadas na Figura 3 foram:

- Preparo de materiais de teste e do meio de cultura (solução salina a 3% em pH entre 8-9);
- Preparo de soluções e suspensões do IFA e do medicamento para se obter 50 mg/L de NVP em solução salina a 3% (pH 8-9);
- Incubação dos cistos dormentes em solução salina a 3%, pH 8-9, sob luz artificial, por 36 a 48 horas e eclosão dos ovos com os náuplios (larvas) para o ensaio;
- Montagem do teste em triplicata para cada concentração testada e controle negativo em salina 3%, pH 8-9.

- Tempo de teste com exposição dos náuplios às substâncias por 24 h sob luz artificial;
- Avaliação do teste que consistiu na contagem de náuplios mortos e vivos em cada concentração e no controle negativo. O percentual de mortalidade foi utilizado para a determinação estatística da CE50% e CE10%.

Figura 3 - Etapas do teste de mortalidade de *A. salina*



Fonte: Elaborado pela autora

No ensaio para *A. salina* seguiu-se o seguinte delineamento experimental:

- Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a mortalidade/imobilidade da espécie exposta ao IFA;
- Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a mortalidade/imobilidade da espécie exposta ao medicamento à base de NVP.

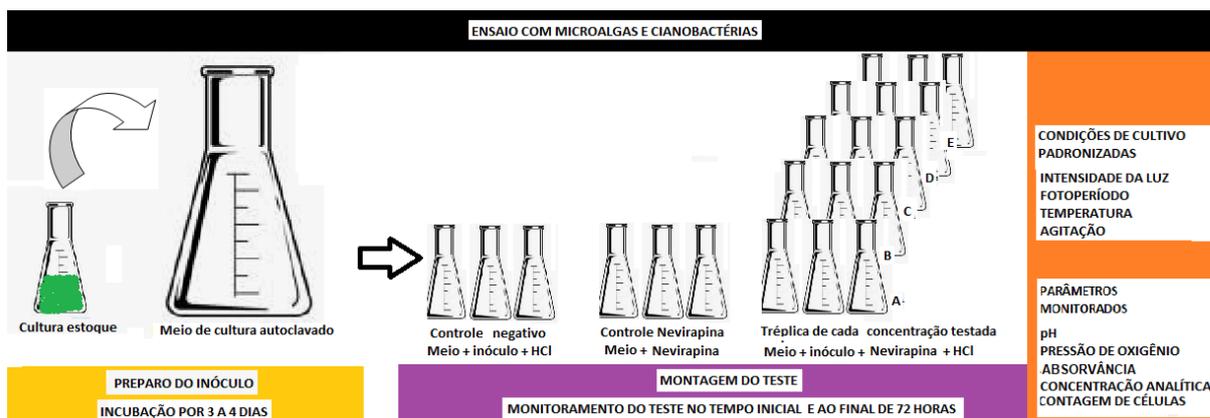
3.4.2 Teste de inibição do crescimento de *C. vulgaris*

O teste seguiu o Protocolo 201 (OCDE, 2011) por 72 h com adaptações. A faixa de concentração de 5,00 a 50,00 mg L⁻¹ de NVP testadas basearam-se na literatura e nos testes preliminares. As etapas do teste, ilustradas na Figura 4, consistiram em:

- Preparo de materiais, do meio de cultura de teste;

- Preparo de uma solução/suspensão de estoque separadamente de ambos, o IFA e o medicamento, em pH 1-2, na concentração de 2360 mg L⁻¹ de NVP, em ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L, para que se obter a NVP solúvel, possibilitando a adição da massa requerida para cada concentração a ser testada no meio de cultura BG-11;
- Cultivo de espécies no meio de cultura BG-11;
- Preparo do inóculo *C. vulgaris* no meio de cultura BG11 com MOPS;
- Incubação à temperatura de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro até a fase de crescimento exponencial e densidade celular de aproximadamente 1,0E+07 células/mL;
- Determinação da densidade celular pela contagem de células em microscópio óptico;
- Distribuição de 97 mL da cultura em fase de crescimento exponencial para cada concentração aos erlenmeyers;
- Adição do volume entre zero e 3 mL da substância testada nas triplicatas de erlenmeyers;
- Adição de volume de HCl 0,1 mol/L para complementar para 3 mL ao volume de substância adicionada;
- Retirada de alíquota e contagem de células no tempo inicial de teste para erlenmeyer de cada triplicata de cada concentração;
- Incubação por 72 h em condições padronizadas de luz, temperatura, fotoperíodo e agitação;
- Retirada de alíquota e contagem de células no tempo final de teste para erlenmeyer de cada triplicata de cada concentração;
- A CE50% é obtida a partir do percentual de inibição do crescimento de cada concentração em relação ao grupo controle.

Figura 4 - Etapas do teste de inibição do crescimento de *C. vulgaris*



Fonte: Elaborado pela autora

O delineamento experimental para a espécie *C. vulgaris* foi:

- Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a inibição do crescimento da espécies expostas ao IFA;
- Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a inibição do crescimento da espécie exposta ao medicamento à base de NVP.

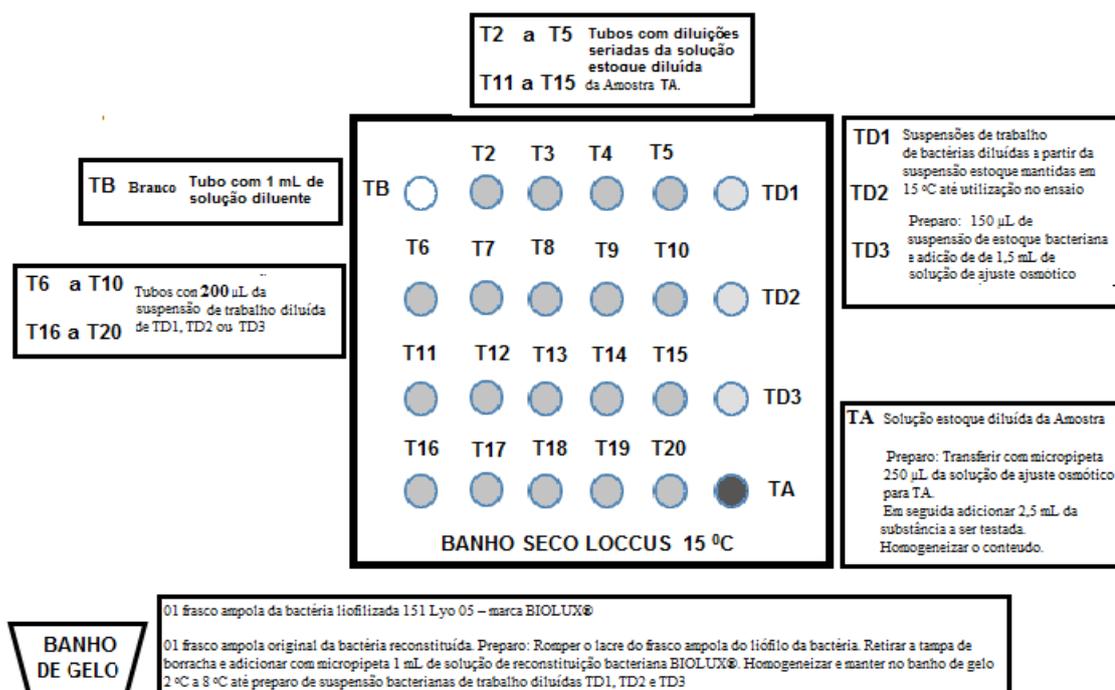
3.4.3 Teste de inibição de bioluminescência de *A. fischeri*

O preparo e o teste consistem nas etapas esquematizadas na Figura 5, conforme as diretrizes da Organização Internacional de Normalização, número 11348-3 (ISO, 2007):

- Preparo e caracterização da substância a ser testada;
- Preparo das soluções salina 2% e de reconstituição;
- Caracterização das soluções, verificação de adequação às condições de teste e ajustes, caso necessário;
- Ambientação do frasco de líofilo à temperatura de 2°C e reconstituição da bactéria liofilizada em solução de reconstituição, mantendo a 2°C até diluição de trabalho;

- Preparo de suspensão de trabalho da bactéria e manutenção em banho seco a 15°C;
- Início do ensaio com a transferência aos tubos de teste do volume da suspensão de trabalho da bactéria para registro pelo equipamento imediata da inibição de luminescência no tempo inicial;
- Imediatamente, adição do volume da substância a ser testada, exceto no branco ao qual foi adicionado salina, mantendo os tubos teste no banho seco a 15 °C;
- Após 15 minutos, foram registrados os valores de inibição luminescência no tempo final exibido para cada amostra no equipamento.

Figura 5 - Preparo do teste de bioluminescência de *A. fischeri*



Fonte: Elaborado pela autora

Os ensaios foram realizados conforme o delineamento experimental a seguir:

- Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a inibição de bioluminescência da espécie exposta ao IFA;

b) Determinação da CE50% e CE10% em que se observa a inibição de bioluminescência da espécie exposta ao medicamento à base de NVP.

3.4.4 Teste de citogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade *A. cepa*

Primeiramente, foram preparadas as soluções para fixação de radículas, coloração e fixação de lâminas permanentes.

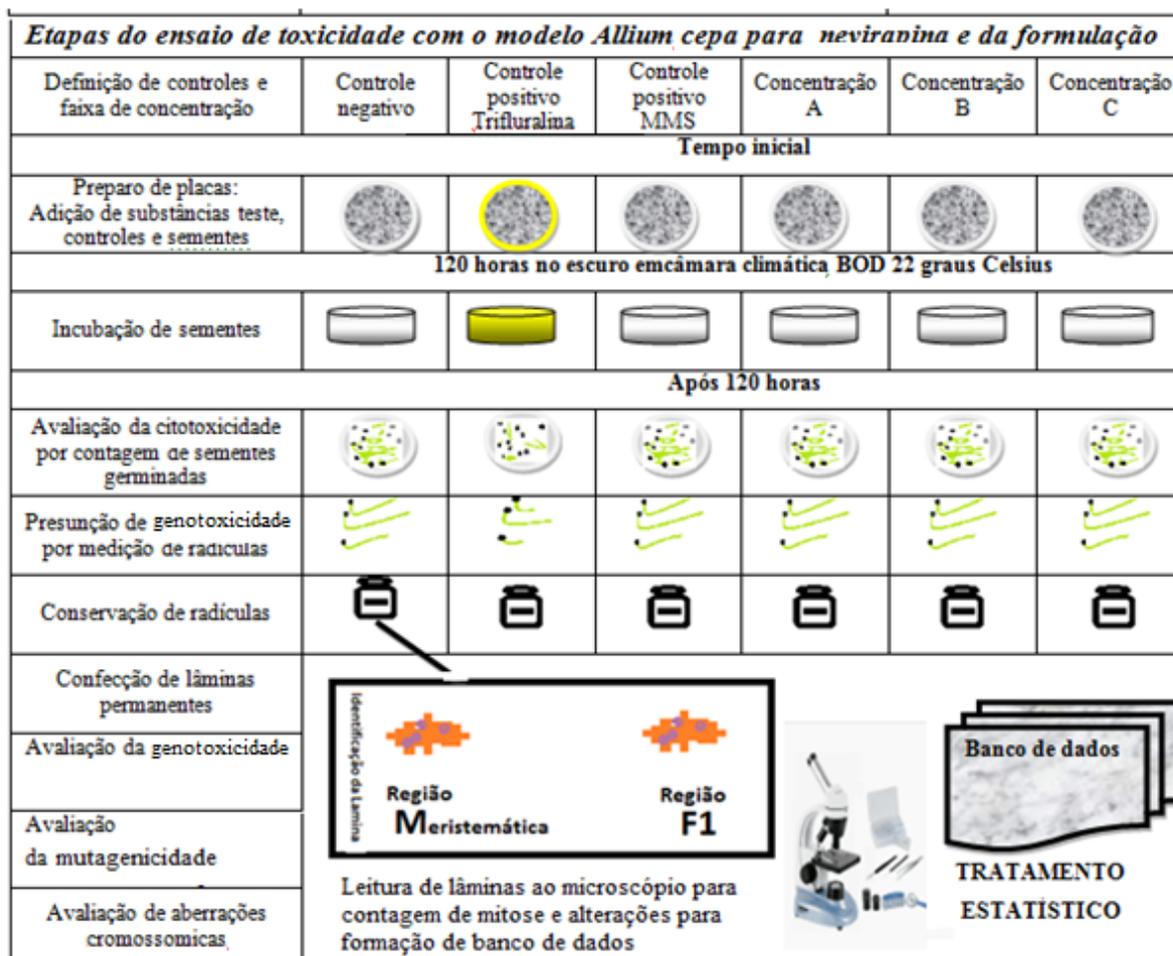
O fixador de *Carnoy* foi preparado com ácido acético glacial e etanol P.A. na proporção 1:3 respectivamente para uso imediato para a fixação e conservação de radículas.

O carmim acético 1 % foi preparado em béquer de vidro a partir de 1 g de carmim solubilizado em 100 mL de ácido acético 45%. A mistura foi fervida por 2 a 3 horas, filtrada fria e armazenada em frasco de vidro âmbar na geladeira. O carmim acético é utilizado como contra-corante para visualizar o citoplasma.

Para o reativo de *Schiff*, misturou-se 1,5 g de fucsina básica sob agitação em 300 mL água aquecida a 50 °C e adicionou-se 45 mL de ácido clorídrico 1 mol/L e 4,5 g de metabissulfito de sódio. O aquecimento e a agitação foram mantidos por quinze minutos e em seguida a mistura foi armazenada ao abrigo da luz por 24 horas. Após o repouso, adicionou-se 1 g de carvão ativado e agitou-se o sistema que foi filtrado e armazenado na geladeira em frasco escuro, envolto por papel alumínio e mantido ao abrigo da luz. Para cada dia de trabalho foi separado cerca de 10 mL em frasco limpo com conta-gotas para o preparo de lâminas do dia. O reativo de *Schiff* é utilizado na reação Feulgen. Essa reação é uma hidrólise ácida do DNA que retira suas bases púricas, deixando um ponto para ligação aldeídica no carbono 1 da pentose à qual a p-rosanilina, componente da fucsina básica (incolor no reativo de *Schiff*), se liga e torna-se púrpura-lilás. O tempo é crítico para remoção adequada de purinas, sem ruptura dos componentes da cromatina, para que o material genético seja corado com bom contraste (MELLO; VIDAL, 1978).

Após o preparo de todas as placas, lâminas e reagentes, foram executadas as etapas do teste esquematizado na Figura 6:

Figura 6 - Etapas do teste de toxicidade com o modelo *A. cepa*



Fonte: Elaborado pela autora

O delineamento experimental foi o seguinte:

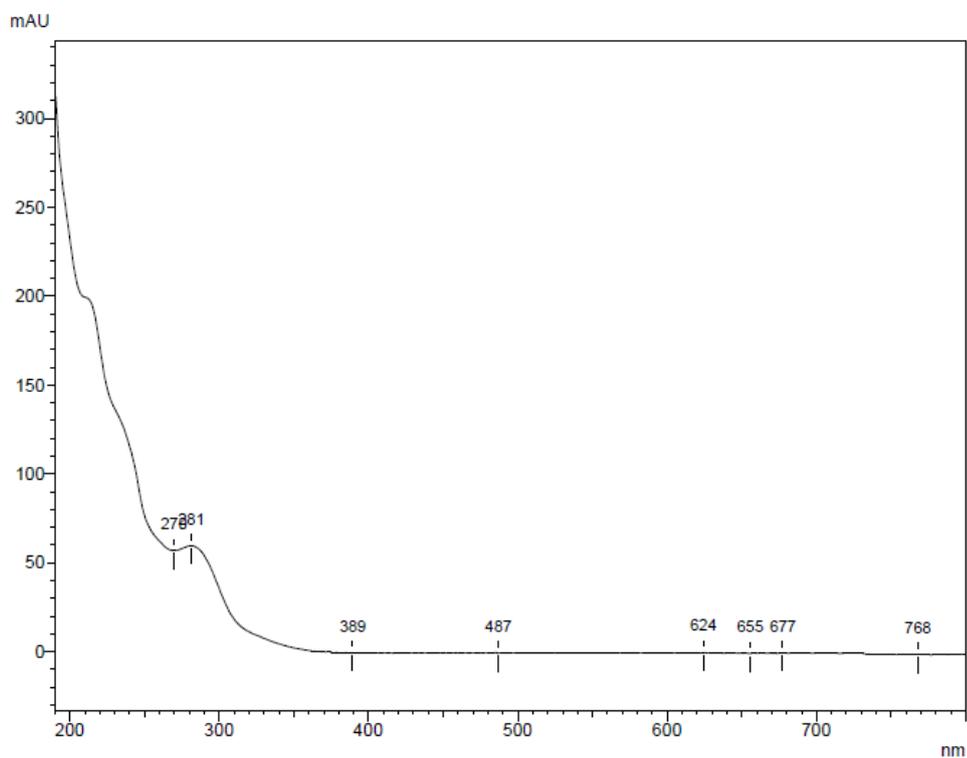
- a) Avaliação do potencial citotóxico por meio da avaliação do índice de germinação de sementes, seguindo o teste de Christofletti, Francisco e Fontanetti (2012), adaptado, utilizando-se 25 sementes de *A. cepa* expostas continuamente a quatro mL da solução/suspensão de trabalho do IFA ou do medicamento à base de NVP em cada placa de Petri autoclavada e forradas com papel de filtro.

- b) Avaliação do potencial citotóxico por meio do crescimento radicular, seguindo os estudos de Onwuamah *et al.* (2014) com adaptações para o uso de radículas emergentes das sementes germinadas;
- c) Conclusão do estudo de citotoxicidade por meio da avaliação dos índices mitóticos, entre os grupos expostos ao IFA e ao medicamento à base de NVP e dos controles negativo e positivo, seguindo os critérios de Caritá e Marin-Morales (2008);
- d) Avaliação do potencial genotóxico para a espécie por meio da comparação dos índices de aberrações cromossômicas do IFA e medicamento à base de NVP com os controles negativo e positivo, seguindo o protocolo de Grant (1982; 1994) e Caritá, Mazzeo e Marin-Morales (2019) com adaptações;
- e) Avaliação do potencial mutagênico para a espécie por meio da comparação dos índices de mutagenicidade do IFA e medicamento à base de NVP com os controles negativo e positivo, adaptando-se os estudos de Ma *et al.* (1995) e Caritá; Mazzeo e Marin-Morales (2019);

4 CARACTERIZAÇÃO, DOSEAMENTO E ESTABILIDADE DE NVP NOS MEIOS DE TESTE

Seguindo o método analítico validado, foram avaliados os espectros de varredura no ultravioleta (UV) de NVP em água, em salina e nos meios de cultura ASM-1 e BG-11 com MOPS e não foram observados deslocamentos em relação ao padrão de NVP (Figura 7) em acetonitrila/água (2:3).

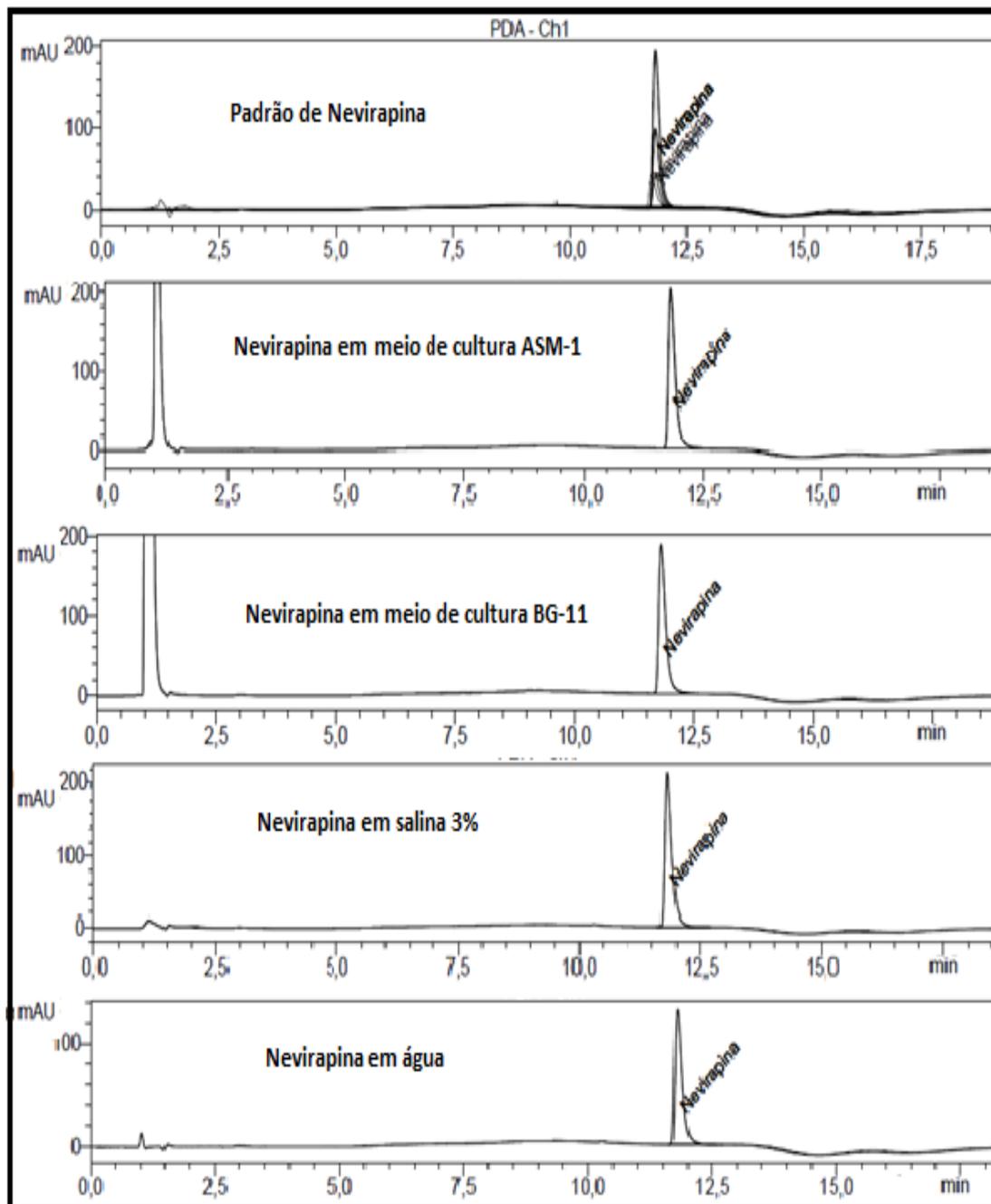
Figura 7 – Espectro do padrão de nevirapina no ultravioleta em acetonitrila: água (2:3)



Fonte: Dados da autora

Os cromatogramas obtidos para todas as soluções apresentaram um pico único com tempo de retenção de 11,8 minutos, similar ao padrão (Figura 8). Nos cromatogramas referentes aos meios de cultura apareceu um pico distinto abaixo de 2,5 minutos provavelmente devido a componentes desses meios.

Figura 8 – Cromatogramas de padrão de NVP em acetonitrila: água (2:3), água, salina 3% e meios de cultura ASM-1 e BG-11 tamponados



Fonte: Dados da autora

A caracterização das soluções de NVP foi realizada em água, em salina e nos meios de cultura ASM-1 e BG-11; as variações observadas quanto à turbidez, salinidade, pH e concentração analítica da fração solúvel nos meios (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização físico-química de soluções de nevirapina (NVP) em água, salina 3% e meio de cultura BG-11 com MOPS

Soluções	Parâmetros físico-químicos				
	Aspecto/Cor	Turbidez (NTu)	pH	Salinidade (g/L)	Concentração (mg/L de NVP)
NVP em água	Límpida e transparente	0,09	6,2	0,00	69,60
NVP em salina 3%	Límpida e transparente	0,12	8,5	3,00	43,73
NVP em meio de cultura BG-11 com MOPS	Límpida e transparente	0,09	7,2	0,34	61,30

Fonte: Dados da autora

Na Tabela 2 estão os dados da avaliação da estabilidade das soluções de NVP em água, no meio de cultura BG-11 com MOPS.

Tabela 2 - Variação de parâmetros físico-químicos de soluções de NVP em água e em meio de cultura BG-11 no tempo inicial (T0) e após 144 h (TF)

Solução de NVP por meio	parâmetros físico-químicos									
	aspecto/cor		turbidez (NTu)		pH		salinidade (g/L)		Concentração (mg/L de NVP)	
	T0	TF	T0	TF	T0	TF	T0	TF	T0	TF
10,16 mg/L em BG11	límpido	límpido	0,8	0,9	7	7	0,00	0,00	8,2	8,9
17,46 mg/L em água pH 7	límpido	límpido	0,9	0,9	6	6	0,21	0,20	17,3	17,1
24,54 mg/L em água pH 7	límpido	límpido	1,0	0,9	6	6	0,25	0,24	23,9	23,6
32,10 mg/L em água pH 7	límpido	límpido	0,8	0,8	6	6	0,00	0,1	34,9	34,0

Fonte: Dados da autora

Como pode ser observado, não houve variação significativa nos parâmetros físico-químicos e nem na concentração analítica da NVP após 144 h do preparo. Não houve aparecimento de cor ou precipitado, indicando que as condições de teste não afetaram a integridade e concentração do NVP, após 144 h nos meios.

Em todos os testes, os parâmetros físico-químicos foram monitorados no tempo inicial e final. Todas as amostras que apresentavam particulados dispersos foram mantidas em repouso por 60 minutos antes da coleta. As variações encontradas durante os testes não foram significativas, indicando que não havia fatores que pudessem interferir na resposta do organismo-teste.

5 ESTUDO I: “OS EFEITOS TÓXICOS DO ANTIRRETROVIRAL NEVIRAPINA E DE UM MEDICAMENTO À BASE DE NEVIRAPINA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS”

The toxic effects of the antiretroviral nevirapine and a nevirapine-based drug for aquatic organisms

Los efectos tóxicos del antirretroviral nevirapina y de um fármaco a base de nevirapina para los organismos acuáticos

Artigo publicado na *Research, Society and Development*, v. 11, n. 2, e19211225014, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25014>

Resumo

A toxicidade aquática de ingredientes ativos farmacêuticos (IFAs) e medicamentos é pouco explorada na literatura. A nevirapina (NVP) é um antirretroviral, inibidor não nucleosídeo da enzima transcriptase reversa. Este estudo avaliou a toxicidade aquática desse IFA isolado e como um medicamento à base de NVP. Para isso, foram analisados os efeitos sobre a viabilidade dos organismos aquáticos *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* e *Aliivibrio fischeri*. Foram aplicados os testes de inibição do crescimento por 72 h para a microalga *C. vulgaris*, de mortalidade por 24 h para o microcrustáceo *A. salina* e o de inibição da bioluminescência por 15 min para a bactéria *A. fischeri*. O modelo estatístico de dose-resposta não paramétrico log-logístico foi utilizado para obter as concentrações efetivas (CE) de 50% e 10% para a NVP isolada e para o medicamento. Constatou-se que a NVP isolada afetou a viabilidade das três espécies estudadas, porém, o medicamento à base de NVP não foi tóxico para *A. salina*. Ressalta-se que a CE50% de NVP diferiu estatisticamente entre o IFA e o medicamento para *A. fischeri* e *A. salina*. Observou-se também que há uma estreita faixa de concentração entre o aparecimento dos primeiros efeitos observáveis e dos efeitos tóxicos de NVP nessas espécies. Isso reforça a importância do estudo e do controle de lançamento desse IFA no ambiente. Por fim, concluiu-se que é possível implementar o monitoramento da toxicidade ambiental de micropoluentes na rotina industrial, utilizando testes de toxicidade padronizados e economicamente acessíveis, que oferecem rapidez e praticidade na análise de efluentes.

Palavras-chave: Toxicidade aquática; Segurança ambiental; Ecotoxicidade; Micropoluentes.

Abstract

The aquatic toxicity of active pharmaceutical ingredients (APIs) and drugs is little discussed in literature. Nevirapine (NVP) is an antiretroviral, non-nucleoside reverse

transcriptase inhibitor. This study evaluated the aquatic toxicity of this API alone and as an NVP-based drug. For this purpose, we analyzed the effects on the viability of the aquatic organisms *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* and *Aliivibrio fischeri*. The observed effects were, per organisms: the growth inhibition tests for 72 h for the microalgae *C. vulgaris*; the mortality for 24 h for the microcrustacean *A. salina*; and the bioluminescence inhibition test for 15 min for the bacteria *A. fischeri*. The non-parametric log-logistic dose-response statistical model was used to obtain effective concentrations (EC) of 50% and 10%, for NVP API and for the NVP-based drug. Isolated NVP affected the viability of three studied species; on the other hand, the drug based on NVP was not toxic to *A. salina*. It is noteworthy that the EC50% of NVP differed statistically between the API and the drug for *A. fischeri* and *A. salina*. It was also observed that there is a narrow concentration range between the appearance of the first observable effects and the toxic effects of NVP in these species. This reinforces the importance of studying and controlling the release of this API into the environment. Finally, it was concluded that it is possible to implement monitoring of the environmental toxicity of micropollutants in the industrial routine, using standardized and economically accessible toxicity tests, which offer speed and practicality in the analysis of effluents.

Keywords: Aquatic toxicity; Environmental safety; Ecotoxicity; Micropollutants.

Resumen

La toxicidad acuática de los ingredientes farmacéuticos activos (API) y los fármacos está poco explorada en la literatura. La nevirapina (NVP) es un inhibidor de la transcriptasa inversa antirretroviral no nucleósido. Este estudio evaluó la toxicidad acuática de este API solo y como un fármaco basado en NVP. Para ello, se analizaron los efectos sobre la viabilidad de los organismos acuáticos *Chlorella vulgaris*, *Artemia salina* y *Aliivibrio fischeri*. Se aplicaron las pruebas de inhibición del crecimiento durante 72 h para la microalga *C. vulgaris*, la mortalidad durante 24 h para el microcrustáceo *A. salina* y la prueba de inhibición de bioluminiscencia durante 15 min para la bacteria *A. fischeri*. Se utilizó el modelo estadístico log-logístico de dosis-respuesta no paramétrico para obtener concentraciones efectivas (CE) del 50% y el 10% para NVP sola y para el fármaco. Se encontró que la NVP aislada afectó la viabilidad de las tres especies estudiadas, sin embargo, el fármaco basado en NVP no fue tóxico para *A. salina*. Es de destacar que el CE50% de NVP difirió estadísticamente entre el API y el fármaco para *A. fischeri* y *A. salina*. También se observó que existe un rango de concentración estrecho entre la aparición de los primeros efectos observables y los efectos tóxicos de NVP en estas especies. Esto refuerza la importancia de estudiar y controlar la liberación de este API al medio ambiente. Finalmente, se concluyó que es posible implementar el monitoreo de la toxicidad ambiental de micro contaminantes en la rutina industrial, utilizando pruebas de toxicidad estandarizadas y económicamente accesibles, que ofrecen rapidez y practicidad en el análisis de efluentes.

Palabras clave: Toxicidad acuática; Seguridad ambiental; Ecotoxicidad; Micro contaminantes.

5.1 Introdução

Os medicamentos são micropoluentes (MP) e constituem um risco à saúde pessoal, à biodiversidade e ao meio ambiente quando descartados de forma inadequada, afetando governo e sociedade (KÜMMERER, 2009; VERLICCHI *et al.* 2012; BOXALL *et al.*, 2014; STEWART *et al.*, 2014; HUBE; WU, 2021; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). A formulação de um medicamento é uma associação entre o ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e os excipientes (VAN DER MERWE *et al.*, 2020). No ambiente, o IFA pode ser lançado de várias formas e percorrer vários caminhos, disseminado para outros ambientes ou permanecer estacionado na fonte de emissão, incorporando-se ou não aos sedimentos. A exemplo do esgoto industrial, o IFA pode ser encontrado isolado ou associado aos excipientes. Por outro lado, no esgoto doméstico, o IFA pode ser excretado de forma inalterada ou como metabólitos de sua biotransformação e excreção. A diluição e degradação são maneiras de atenuar a fonte de emissão do IFA, porém muitos deles são pouco solúveis, muito estáveis, não biodegradáveis e podem persistir no meio ambiente. De imediato, o lançamento inadequado do IFA pode contaminar os corpos hídricos locais, e ao longo do tempo pode ser carregado para rios e lagoas e até atingir os estuários, ameaçando também a vida marinha (ZAKRZEWSKI, 2002; SHEA, 2004; LUO *et al.*, 2014).

A nevirapina (NVP) é um IFA, lançado no mercado mundial pela Boehringer Ingelheim em 1996 para terapia antirretroviral (TARV). Essa substância possui características físico-químicas como baixa solubilidade em água (90 mg L^{-1}), alta lipofilicidade, coeficiente de partição octanol: água (\log de P) igual a 2,5, alta estabilidade à luz, à variação de pH e de temperatura (KIM *et al.*, 2019) e baixa biodegradabilidade (JAIN *et al.*, 2013; VAŇKOVÁ, 2010). Atualmente, os medicamentos à base de NVP são usados por cerca de trinta e cinco por cento das pessoas que vivem com o Vírus da Imunodeficiência Humana (*HIV*) no mundo, em especial, nos países de renda média e baixa, devido a sua eficácia e baixo custo (GUPTA *et al.*, 2016). A dose diária definida (DDD) de NVP é 200 mg e após a

administração, cerca de 5% do IFA é excretado na urina na forma inalterada (VIRAMUNE, 2019).

Nesse sentido, o estudo da toxicidade aquática de NVP é relevante em função de suas propriedades químicas e das implicações do seu mecanismo de ação para organismos presentes no meio ambiente. Além disso, ressalta-se que é comum que substâncias biologicamente ativas em uma espécie induzam efeitos também em outras espécies (KAISER, 1998). No que se refere ao seu mecanismo de ação, a inibição alostérica da transcriptase reversa (TR), enzima responsável pela polimerização das moléculas do ácido desoxirribonucleico (DNA) e do ácido ribonucleico (RNA) do *HIV* (DAS *et al.*, 2012), é possível que a NVP possa inibir a transcrição do DNA em outras espécies, dada a semelhança funcional entre enzimas de vias metabólicas de diferentes espécies. Cabe considerar também que NVP tem capacidade de formar complexo com vários grupos químicos (KROEGER SMITH *et al.*, 1995) e de desencadear a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) (HULGAN *et al.*, 2003). Estes mecanismos inespecíficos são responsáveis por importantes efeitos adversos em humanos (DEL VALLE *et al.*, 2013) e podem afetar outras espécies também.

Esse estudo pretende demonstrar que é possível implementar testes de toxicidade ambiental de IFAs na rotina industrial com o uso de organismos-teste consolidados na literatura como as três espécies elencadas para o estudo. A primeira delas foi a microalga *Chlorella vulgaris*, uma espécie fotossintética comumente utilizada em estudos de ecotoxicidade para avaliação da toxicidade aguda e crônica (COSTA *et al.*, 2008, NIE *et al.*, 2008; GEIGER; HORNEK-GAUSTERER; SAÇAN, 2016). Nessa espécie, a toxicidade é avaliada pela inibição do crescimento da biomassa de algas, conforme teste padronizado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2011). Já a segunda espécie estudada foi o microcrustáceo *Artemia salina*, um consumidor primário e filtrador, cuja toxicidade aguda é avaliada pela inibição da mobilidade (mortalidade) provocada pelo MP. Por último, foi utilizada a espécie *Aliivibrio fischeri*, uma bactéria gram-negativa de vida livre, que possui um processo metabólico especializado capaz de dissipar energia

luminosa. Este sistema é extremamente sensível à presença de substâncias que podem levar a uma redução da bioluminescência bacteriana, indicando perda da viabilidade celular (NUNES-HALLDORSON & DURAN, 2003; LEITÃO & SILVA, 2010).

Além disso, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*GHS*), a NVP inicialmente classificada como categoria de risco IV em 2017, foi reclassificada em 2019 para categoria de risco III para organismos aquáticos em função de suas características químicas. Isso evidencia que, embora os estudos de toxicidade ambiental sejam requeridos pelas agências reguladoras para registro de novos medicamentos, pouca informação se tem divulgada para apoiar a regulação de MP no ambiente aquático (BIO INTELLIGENCE SERVICE, 2013). Nesse sentido, este artigo também pretende acrescentar informações sobre o risco de toxicidade do IFA isolado e de um medicamento à base de NVP para as três espécies aquáticas em estudo, por meio não só dos valores da CE50%, mas também da CE10%.

5.2 Metodologia

5.2.1 Substâncias químicas

O IFA utilizado foi a nevirapina anidra lote C5028-12009M, 100,49%, da Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd (Linhai, China) e o medicamento foi o Nevirax® 200 mg comprimidos, lote 14030011, fabricado pela Fundação Ezequiel Dias (Funed) (Belo Horizonte, Brasil). Ambos foram doados para o estudo pela Funed, aprovados pelo seu controle de qualidade. Para todas as etapas, foram utilizados reagentes e solventes grau analítico ou grau para cromatografia líquida de alta eficiência.

5.2.2 Soluções padrão para a quantificação da NVP

Uma solução padrão de estoque foi preparada com massa de 15,82 mg do padrão de referência NVP anidra da *United States Pharmacopeia (USP)*. A massa foi

transferida para um balão volumétrico de 25 mL adicionando 10 mL de acetonitrila e 15 mL da água tipo I (Millipak® 20 Millipore Direct – Q® 3UV). A partir da solução estoque foram preparadas três soluções padrão de trabalho de NVP (12,66 mg L⁻¹, 31,64 mg L⁻¹ e 63,28 mg L⁻¹) para a curva de calibração.

5.2.3 Soluções/suspensão de NVP para testes

A concentração analítica para NVP em cada meio de exposição foi determinada em cada solução/suspensão de trabalho e no tempo inicial do teste para o IFA e para o medicamento. Este estudo não realizou testes com IFA e o medicamento em concentrações superiores a 50,0 mg L⁻¹ de NVP em função da fração solúvel previamente determinada nos meios de cultura. O uso de adjuvantes de solubilidade foi descartado porque alteraram os efeitos tóxicos do IFA e do medicamento nos estudos prévios, o que não é um fator desejável nos testes. As concentrações estão descritas na metodologia de cada teste.

5.2.4 Meio de cultura do teste de *C. vulgaris*

O meio de cultura BG11 (RIPPKA *et al.*, 1979) foi preparado para ensaios de *C. vulgaris* com adição de tampão de ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico (MOPS) na concentração de 750 mg L⁻¹ e o pH foi ajustado para 8,0.

5.2.5 Equipamentos e condições cromatográficas para determinação analítica da NVP

O sistema de cromatografia líquida de ultraeficiência (UHPLC) consistiu de um Shimadzu Nexera-Prominence® UHPLC acoplado a um detector de matriz de fotodiodo (modelo SPD-M20A), ambos da Shimadzu (Columbia, EUA). A separação foi realizada em uma coluna ShimPack XR® C18 (2,0 × 100 mm, diâmetro de partículas de 2,2 µm). O controle do sistema e o gerenciamento dos dados analíticos foram realizados através do software Lab Solutions®, também da Shimadzu. A água tipo I foi fase móvel A e a acetonitrila, a fase móvel B. No tempo inicial, uma mistura

de 98% de fase móvel A e 2% de fase móvel B foi bombeada através da coluna a um fluxo constante de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. Do tempo inicial ao tempo total de execução (20,0 min), um gradiente linear foi definido para atingir 2% de A e 98% de B. A temperatura da coluna foi fixada em $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os espectros foram obtidos para todos os picos na faixa de 190 a 800 nm. O pico de NVP foi monitorado a 214 nm. Uma alíquota de 3 mL de cada amostra foi filtrada em $0,45 \mu\text{m}$ para tubos Falcon para determinação analítica da NVP no tempo inicial de teste. Em seguida, cada amostra foi transferida filtrada em $0,45 \mu\text{m}$ para um frasco do amostrador automático e 3 μL foram injetados no *UHPLC*.

5.2.6 Organismos-teste

O organismo *C. vulgaris* foi isolado do Parque Estadual do Rio Doce (PERD), rotulado e mantido em cultura no Laboratório de Ecologia Aquática, Ecotoxicologia e Limnologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (LIMNEA-ICB/UFMG). Os cistos dormentes de *A. salina* da Maramar® lote 05/2018 foram obtidos no comércio local da cidade de Belo Horizonte, Sudeste do Brasil. A biomassa liofilizada de *A. fischeri* (lote NRRL B-11177) foi obtida da Biolux® (Umwelt Biotechnologia Ambiental, Blumenau, Sul do Brasil), lote 151-Lyo-05.

5.2.7 Testes de inibição de crescimento de *C. vulgaris*

O ensaio de inibição do crescimento da biomassa de *C. vulgaris* foi conduzido com adaptações, de acordo com o Protocolo 201 (OCDE, 2011) por 72 h. Primeiro, o erlenmeyer contendo a cultura de *C. vulgaris* no meio de cultura BG11 com MOPS foi incubado para crescimento à temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro até atingir a densidade celular de aproximadamente $1,0\text{E}+07$ células mL^{-1} . A densidade celular foi determinada pela contagem de células em microscópio óptico. Para os testes foram usadas triplicatas de erlenmeyers para cada concentração e adicionado a cada um o volume de 97 mL da cultura em fase de crescimento exponencial.

Antes da adição do IFA ou do medicamento ao meio de cultura, foi necessário preparar uma solução/suspensão de estoque em pH 1-2 para que se obtivesse a NVP solúvel e dessa forma fosse possível adicionar a massa requerida para cada concentração a ser testada nos meios de cultura. Para isso, ambos, o IFA e o medicamento foram preparados na mesma concentração de estoque (2360 mg L^{-1} de NVP) em ácido clorídrico ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

A faixa de concentração de $5,00$ a $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ de NVP para os testes com o IFA e com o medicamento foi determinada de acordo com a literatura e com os testes preliminares. As concentrações interpoladas foram $5,00$; $10,00$; $15,00$; $20,00$; $25,00$; $30,00$ e $35,00 \text{ mg L}^{-1}$ de NVP para o teste de determinação da $\text{CE}_{50\%}$ e da $\text{CE}_{10\%}$.

Após adição do meio com a cultura ao erlenmeyer, adicionou-se o volume de solução/suspensão de estoque referente à massa de NVP requerida para obter a concentração a ser testada em cada triplicata. Ao final foi adicionado o volume de $\text{HCl } (0,1 \text{ mol L}^{-1})$ suficiente para obter 100 mL de cada concentração da série dentro de cada erlenmeyer.

O IFA e o medicamento foram testados concomitantemente. As triplicatas de erlenmeyers de cada concentração testada do IFA e do medicamento foram incubadas a $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 h claro/ 12 h escuro sob luz fluorescente branca/fria de intensidade de $40\text{-}50 \text{ } \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ (DU *et al.*, 2012) e agitação a 70 rpm por 72h . Os controles negativos (meio de cultura e organismo) e controle de NVP (meio e cultura e NVP) foram submetidos às mesmas condições de teste das amostras.

A densidade celular (células mL^{-1}) foi determinada pela contagem celular (N_0 e N) no início (T_0) e no final do teste (T_F) em cada erlenmeyers de cada triplicata. A taxa de crescimento μ e o percentual de inibição ($I\%$) foram calculados para cada concentração utilizando as seguintes equações:

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) [(T_F - T_0)]^{-1} \quad (\text{equação 1})$$

$$I\% = (\mu T_0 - \mu T_F) [(\mu T_0) (100)]^{-1} \quad (\text{equação 2})$$

A concentração de cada erlenmeyer e o seu respectivo percentual de inibição foram utilizados no modelo dose resposta não paramétrico log-logístico para calcular a CE50% e a CE10%.

5.2.8 Teste de mortalidade (imobilização) de *A. salina*

O método utilizado foi adaptado de Meyer *et al.* (1982). Primeiro, foi preparada uma solução salina a 3% (pH 8-9). Os cistos de *A. salina* foram incubados em solução salina a 3%, pH 8-9, sob luz artificial, por 36 a 48 horas, até a eclosão dos náuplios. A solução/suspensão de trabalho para os testes do IFA e do medicamento foram preparadas para obter 50 mg L⁻¹ de NVP em solução salina a 3% (pH 8-9).

Optou-se por utilizar o termo concentração efetiva (CE) por englobar de forma mais ampla os três efeitos observados no estudo: a inibição do crescimento da biomassa de *C. vulgaris*; a imobilidade que antecede a letalidade ou a mortalidade de *A. salina*; e a inibição da bioluminescência de *A. fischeri*. A CE50% é a concentração efetiva média de amostra que causa o efeito a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste (COSTA *et al.*, 2008). A CE10% é a concentração efetiva em que se observa o efeito em 10% dos organismos.

A faixa de concentração a ser testada foi definida com base na toxicidade da NVP descrita na literatura e nos testes preliminares. A CE50% obtida para *A. Salina* foi utilizada como referência para testes com as outras espécies. As concentrações do IFA e do medicamento foram 12,67; 18.30; 23.94; 29.57; 35.20; 40,83 e 46,46 mg L⁻¹ de NVP. Os testes com o IFA e com o medicamento foram realizados concomitantemente.

Para os testes, três tubos de controle negativo foram preparados com 5,0 mL de solução salina e 10 náuplios em cada um. Uma triplicata de tubos com o volume necessário de solução/suspensão e o volume suficiente de salina para completar 5,0 mL para obter cada concentração do IFA e do medicamento foi preparada; em seguida, adicionados 10 náuplios a cada um. Os tubos foram mantidos a 22 °C sob

luz artificial de 1000 lux por 24h. Em seguida, o número de náuplios imóveis por pelo menos 10 segundos (ou mortos) foi contado (NUNES *et al.*, 2006). A partir do percentual médio de náuplios imóveis (mortos) da triplicata de cada concentração, a CE50% e a CE 10% foram determinadas para IFA e o medicamento utilizando o modelo dose resposta não paramétrico log-logístico.

5.2.9 Teste de inibição de bioluminescência de *A. fischeri*

Os ensaios foram conduzidos em conformidade com a norma de diretrizes da Organização Internacional de Normalização, número 11348-3 (ISO, 2007). Primeiramente, uma solução salina a 2% foi preparada para ser utilizada como diluente. Um frasco de estoque de bactéria liofilizada foi preparado adicionando 1,0 mL da solução de reconstituição Biolux® e foi mantido a 2°C. A suspensão de trabalho de bactérias liofilizadas a 10% foi preparada adicionando-se 0,2 mL da solução de reconstituição para 2 mL de diluente. Ela foi mantida a 15°C em banho seco (Loccus® banho seco, Cotia Sudeste do Brasil).

A solução/ suspensão de trabalho do IFA e do medicamento foram preparadas para obter 50 mg L⁻¹ de NVP em diluente para ajuste prévio da salinidade das amostras dos testes. A faixa de concentração para os testes foi definida com base em testes preliminares e na CE50% de *C. vulgaris* e de *A. salina*. Foram testadas as concentrações 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 mg L⁻¹ de NVP para o IFA e para o medicamento. Para o controle negativo de cada teste foi utilizado somente o diluente.

No tempo inicial, 200 microlitros de suspensão de bactérias foram adicionados aos nove tubos de ensaio mantidos banho seco a 15°C. A bioluminescência da bactéria foi registrada no tempo inicial (T0) para todos os nove tubos pelo luminômetro Biofix® Luminometer (Macherey-Nagel, Dueren, Alemanha). Rapidamente, 800 microlitros de diluente foram adicionados ao primeiro teste do controle negativo. Aos demais tubos foram adicionados 800 microlitros de cada concentração a ser testada. Após a incubação por 15 minutos (TF) em banho seco a 15°C, a porcentagem de

inibição de bioluminescência da bactéria (I%) foi mostrada automaticamente pelo luminômetro para cada tubo. As concentrações de cada tubo e o seus respectivos valores de I% foram utilizados para calcular CE50% e CE10%.

5.2.10 Análise de dados

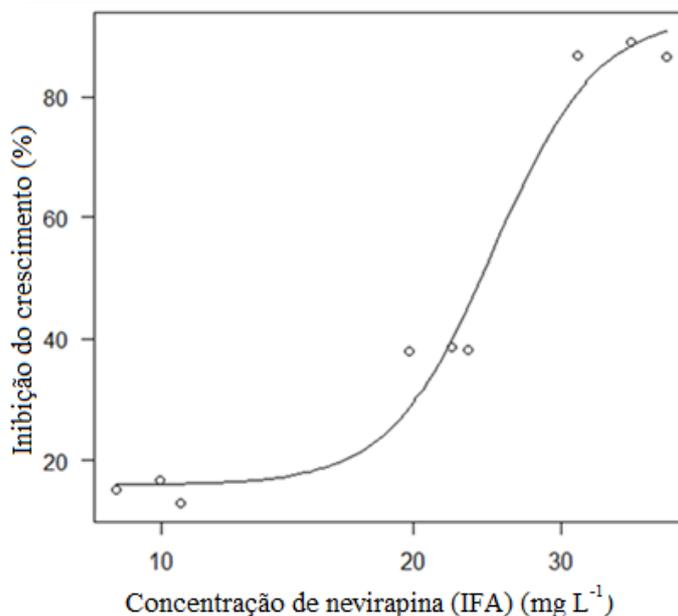
Os modelos de regressão estatística disponíveis na versão 3.4.2 (versão gratuita da *DRC*) foram utilizados na análise de dados para a avaliação da correlação entre as concentrações de NVP *versus* os efeitos observados (RITZ *et al.*, 2015). O modelo dose-resposta não paramétrico log-logístico ofereceu o melhor ajuste dos dados para os três organismos. A partir das curvas dose-resposta de cada organismo para o IFA e para o medicamento foram estimados os valores de CE50% e a CE10% com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) em um nível de significância de 5% (α 5%).

5.3 Resultados

5.3.1 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para *C. vulgaris*

Para os testes com *C. Vulgaris*, cada amostra da série de concentração do IFA e do medicamento no meio de cultura foi caracterizada no início e após 72 h (tempo final de teste). Foram avaliados o aspecto, o pH e a turbidez. Verificou-se que não houve aparecimento de precipitado nas amostras dos meios de cultura contendo IFA. As mesmas se mantiveram límpidas, dentro da faixa de pH de 6-7 e o oxigênio dissolvido em torno de 20%. O nível de turbidez dos meios de cultura expostos ao IFA foi semelhante ao do grupo controle. A variação na contagem de células entre o tempo inicial e o tempo final de teste mostrou que o crescimento *de C. vulgaris* foi inibido pelo IFA. A CE50% e a CE10% obtidas a partir dos dados de contagem de células ajustados ao modelo dose-resposta log-logístico foram 24,90 [21,52 – 28,28] e 18,22 [13,94 - 22,50 mg L⁻¹ de NVP, respectivamente.

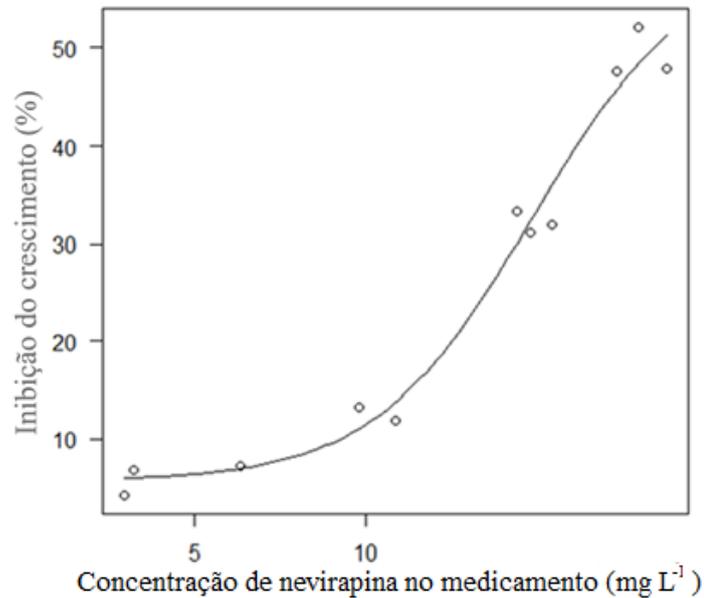
Figura 1 (Estudo I) - Curva de dose-resposta para inibição de crescimento de *C. vulgaris* por 72 h pelo IFA nevirapina.



Fonte: Autores.

Como pode ser observada, a curva dose-resposta da Figura 1 mostra o efeito da concentração do IFA isolado sobre a inibição do crescimento do *C. vulgaris* por 72 h. Referente aos testes com o medicamento, o nível de turbidez nessas amostras dos meios de cultura foi maior que o grupo controle em função da suspensão dos excipientes insolúveis da formulação. Porém, a turbidez não variou durante o tempo de teste. O pH também se manteve entre 6 e 7 e o oxigênio dissolvido em torno de 20%. O método de contagem de células permitiu comparar o efeito do IFA isolado e quando associado aos excipientes (medicamento) sobre a inibição do crescimento de *C. vulgaris*. A Figura 2 mostra curva dose-resposta para inibição de crescimento de *C. vulgaris* quando exposta ao medicamento à base de NVP por 72 h.

Figura 2 (Estudo I) - Curva de dose-resposta para inibição de crescimento do *C. vulgaris* pelo medicamento à base de nevirapina por 72 h.



Fonte: Autores.

À mesma maneira do IFA isolado, a CE50% e a CE10% foram obtidas para o medicamento; os valores foram 19,52 [13,98 – 25,05] e 9,71 [5,95 - 13,46] mg L⁻¹ de NVP, respectivamente.

5.3.2 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para *A. Salina*

Para o microcrustáceo *A. salina*, a maior concentração testada foi de 43,64 mg L⁻¹ do IFA isolado solubilizado em solução salina 3%. Nesta concentração, observou-se 100% dos náuplios mortos após 72 horas de teste. Nos experimentos, não foi observada a mortalidade de náuplios quando expostos à concentração de 12,57 mg L⁻¹ do IFA isolado. Os resultados foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 (Estudo I) - Média percentual de imobilidade (mortalidade) de *A. salina* para as concentrações médias de exposição ao IFA nevirapina por 24 h

Concentração de NVP (IFA) (mg L ⁻¹)		Imobilidade (mortalidade) (%)	
Média (n=3)	Desvio padrão	Média (n=3)	Desvio padrão
12,57	0,70	0,0	0,0
17,06	0,23	13,3	4,7
22,4	0,28	26,7	4,7
27,6	0,27	56,7	4,7
33,02	0,25	76,7	4,7
38,32	0,41	86,7	4,7

Fonte: Autores.

A partir das médias da contagem de náuplios imóveis (ou mortos) e da concentração média de cada triplicata (Tabela 1) foram obtidas a CE50% (27,77|25,89 – 29,65| mg L⁻¹ de NVP) e CE10% (17,12 |15,61- 18,64| mg L⁻¹ de NVP) para o IFA isolado usando modelo log-logístico.

Referente ao medicamento, a maior concentração passível de solubilização em salina 3% foi 50,18 mg L⁻¹ de NVP. Nos testes com medicamento nessa concentração, não foi observado qualquer efeito sobre a mobilidade de *A. salina*.

5.3.3 CE50% e CE 10% do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para *A. fischeri*

Previamente aos ensaios com *A. fischeri*, as soluções de trabalho/suspensões foram caracterizadas em termos de pH, turbidez, condutividade, salinidade (Tabela 2).

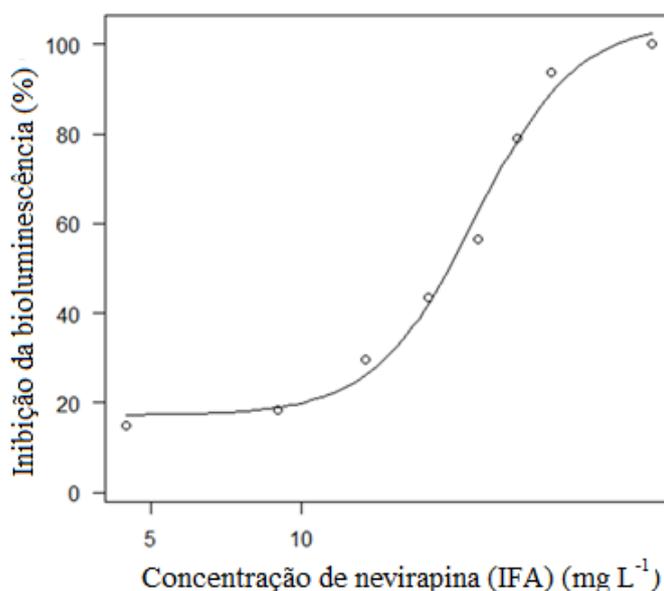
Tabela 2 (Estudo I) - Caracterização das soluções de trabalho/suspensão do IFA isolado e do medicamento à base de NVP para os testes com *A. fischeri*

Solução de trabalho/suspensão	Características físico-químicas					
	Concentração (mg L ⁻¹)	pH	Turbidez (NTU)	Aspecto	Salinidade (mg L ⁻¹)	Oxigênio dissolvido (%)
IFA	44,83	7	1,37	límpido	2,8	20,9
Medicamento	28.59	6	Maior de 1000	turvo	2,0	20,9

Fonte: Autores.

A inibição da bioluminescência para cada diluição da amostra do IFA isolado e do medicamento foi registrada após o tempo de incubação de 15 min. Observou-se que o IFA isolado provocou a inibição de bioluminescência de *A. fischeri* conforme mostrado na curva dose-resposta da Figura 3.

Figura 3 (Estudo I) - Curva dose-resposta para inibição de bioluminescência de *A. fischeri* pelo IFA nevirapina por 15 min.

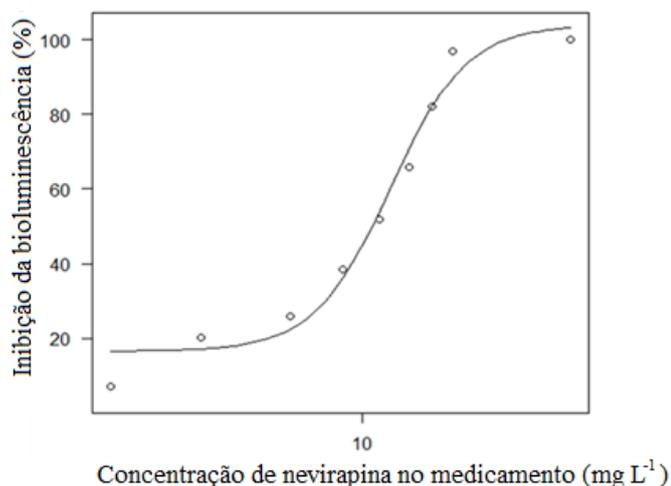


Fonte: Autores.

A partir da curva dose-resposta obtida pelo modelo log-logístico a CE50% estimada para o IFA foi de 22,18 |19,92 – 24,44 e a CE10% foi de 13,63 |10,12 – 16,61 mg L⁻¹ de NVP. Os testes e os cálculos para obtenção da CE50% e da CE10% do

medicamento foram realizados nas mesmas condições do IFA e apresentados na Figura 4.

Figura 4 (Estudo I) - Curva dose-resposta para inibição de bioluminescência de *A. fischeri* pelo medicamento à base de nevirapina por 15 min.



Fonte: Autores.

Foi observada a inibição da bioluminescência de *A. fischeri* pelo medicamento à base de NVP conforme apresentado na curva dose-resposta da Figura 4. A CE50% foi 12,40 |10,97 – 13,84 mg L⁻¹ e a CE10% foi 6,49 |4,65 – 8,32 mg L⁻¹ de NVP.

5.4 Discussão

Em termos ambientais, é importante se ter um parâmetro para comparação da toxicidade aquática entre substâncias. Embora estejam sendo empreendidos esforços para se definir organismos-teste padrão, protocolos de análise e critérios de toxicidade, realização de ensaios de proficiência interlaboratoriais, ainda há alguns desafios para efetivar essa padronização, dentre os quais a diversidade de propriedades físico-químicas das substâncias testadas, o nível de objetividade da medida do efeito avaliado para o organismo-teste e a mimetização das condições do ecossistema avaliado nas condições laboratoriais (RIBO, 1997). Portanto, é fundamental que a técnica empregada não leve o pesquisador a resultados falso-positivos ou falso negativos, ora superestimando, ora mascarando a toxicidade

ambiental da substância testada (WEYMAN *et al.*, 2012). Com base nisso, os resultados experimentais de NVP chamam a atenção para a solubilidade do IFA que é muito afetada pela presença de outros solutos e que limitou à 50 mg L⁻¹ a concentração máxima nos meios de cultura dos testes que permitia testar nas mesmas condições o IFA isolado e o medicamento à base de NVP.

Os dados da literatura sobre NVP são raros e referem-se à época do lançamento do IFA. A toxicidade ambiental de NVP foi descrita utilizando *Pseudokirchnerella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) e *Daphnia magna*, encontrando-se os valores de 43,0 mg L⁻¹ e 76,9 mg L⁻¹ para as concentrações efetivas de NVP. (BOEHRINGER INGELHEIM, 2015).

5.4.1 Efeitos de NVP para *C. vulgaris*

Segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (2019), substâncias que apresentam CE50% dentro da faixa de 10 <CE50% ≤100 mg L⁻¹, não oferecem risco à toxicidade aguda para microalgas e microcrustáceos, mas são de interesse ambiental. Comparando-se este parâmetro com os valores de CE50% encontrados para o IFA isolado e para o medicamento, pode-se afirmar que a NVP não é uma substância tóxica para *C. vulgaris*, mas é de interesse ambiental.

Neste estudo, o valor da CE50% do NVP para *C. vulgaris* foi duas vezes menor que a CE50% relatada por Boehringer Ingelheim (2015) para a microalga *S. Capricornutum*; espécie de referência no protocolo de testes de toxicidade aquática da OECD (2011). Comparando-se as duas espécies, *C. vulgaris* mostrou ser um modelo mais sensível que *S. Capricornutum* para estimar o risco no ambiente aquático de NVP. Geralmente, essas variações se devem às características constitucionais específicas das espécies utilizadas, que podem ser naturalmente induzido por vias adaptativas que lhes concedem maior resistência ao xenobiótico (LI *et al.*, 2016).

A espécie *C. vulgaris* foi sensível ao IFA isolado e associado à formulação, porém as CE50% não foram estatisticamente diferentes. Considerando que apenas a fração solúvel interage diretamente com organismos aquáticos, os resultados sugeriram que os excipientes não interferiram na inibição de crescimento de *C. vulgaris* induzidas pela NVP. Embora tenha sido descrito um aumento da toxicidade das formulações de vários IFAs para microalgas *C. vulgaris*, esse efeito não se mostrou importante no caso da formulação à base de NVP. Esse resultado diverge dos relatos de Silva *et al.* (2014) sobre uma variação de 0,25 a 15,00 mg L⁻¹ na CE50% de cinco formulações de fluoxetina no crescimento de *C. vulgaris* em função da presença de excipientes. Cabe ressaltar a limitação do presente estudo pois o resultado refere-se a uma única formulação à base de NVP.

A microalga *Chlorella vulgaris* é amplamente encontrada nos ambientes de água doce, também tem sido isolada de águas de enseadas marinhas e águas salobras dos estuários (GONZÁLEZ *et al.*, 2013; DARIENKO *et al.*, 2019). Nesse estudo, a espécie mostrou facilidade de aclimação e rápido crescimento (LI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018) confirmando ser uma boa ferramenta para avaliação da toxicidade aguda e crônica (COSTA *et al.*, 2008).

5.4.2 Efeitos de NVP para *A. salina*

A CE50% para a espécie *A. salina* não se enquadra nos critérios de toxicidade aguda, mas aponta que a NVP é uma substância com potencial de risco para a espécie segundo os critérios do GHS (2019). A espécie mostrou-se um modelo sensível para estimar a toxicidade ambiental do IFA isolado, porém, para os estudos de toxicidade de matrizes complexas, é importante avaliar sua adequação do seu uso caso a caso. Nesse estudo, a presença de excipientes alterou a resposta do organismo ao teste, ainda que o nível de concentração de NVP detectado no meio de cultura tenha sido similar para os testes com IFA e ao medicamento.

A mortalidade de *A. salina* ocorreu em concentração de NVP três vezes menor que a descrita por Boehringer Ingelheim (2015) para o microcrustáceo de água doce *D.*

Magna, sugerindo que para esse IFA, a espécie *A. salina* foi o modelo mais sensível para estimar a toxicidade (ONBASILI & DUMAN, 2010; LIBRALATO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*; 2018). Vale ressaltar que, de acordo com a literatura, comparando-se o risco tóxico entre os ARVs, em termos de CE50%, a NVP oferece maior risco para *A. salina* que o abacavir (CE50% > 100,0 mg L⁻¹) (MINGUEZ *et al.*, 2016) e que o tenofovir desoproxil (CE50% 111,82 | 103,18 - 120,45 | mg L⁻¹) (SILVA *et al.*, 2019).

A mobilidade é fundamental para a sobrevivência de *A. salina*, uma vez que suas brânquias ciliadas podem não só coletar oxigênio dissolvido na água, mas também filtrar partículas de alimentos (NUNES *et al.*, 2006). A concentração do IFA que causou 100% de mortalidade de *A. salina* foi apenas duas vezes maior que a CE10%, indicando um curto intervalo entre a observação dos primeiros efeitos e o desfecho final (mortalidade). Esta observação sugere a ocorrência de um mecanismo celular de saturação rápida, tornando a espécie muito sensível ao IFA nesta faixa de concentração. Considerando que a NVP tem a capacidade de agir como um inibidor enzimático, é provável que enzimas relacionadas à mobilidade sejam alvo de inibição inespecífica por essa substância.

O uso do teste de *A. salina* como preditor de toxicidade de extratos vegetais e MP tem sido ressaltado em vários trabalhos, dada a boa correlação com os ensaios *in vivo* (AMARANTE *et al.* 2011) e *in vitro* (RAJABI *et al.*, 2015). Tem sido descrito que a espécie pode ser usada para explorar a toxicidade aguda de IFAs de diferentes origens devido à sua sensibilidade às condições externas que podem comprometer sua mobilidade (NUNES *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*; 2021), corroborando os resultados desse estudo. Os testes também confirmaram sua baixa complexidade, praticidade, rapidez e facilidade de execução e de resposta (MARTINS *et al.*; 2021). Nesse sentido, essa espécie que constitui um elo entre produtores primários e organismos superiores pode ser utilizada em estudos para avaliação de bioacumulação.

5.4.3 Efeitos de NVP para *A. fischeri*

A bactéria *A. fischeri* também se mostrou sensível à NVP, porém houve diferença significativa (os intervalos de confiança não estão sobrepostos) entre as CE 50% do IFA e do medicamento. Para esta espécie, a turbidez do meio de teste com o medicamento foi controlada conforme protocolo padrão para substâncias em suspensão. Assim, não se atribuiu exclusivamente à turbidez a diferença entre o nível de concentração de NVP do IFA e do medicamento que provocaram a inibição da bioluminescência de *A. fischeri*. Esse resultado é corroborado pelas observações de Jacob *et al.* (2016) que testou a toxicidade de dez IFAs em três diferentes formulações usando *A. fischeri*, demonstrando que os excipientes promovem alteração na resposta à toxicidade.

Na literatura foram descritos outros IFAs com o mesmo nível de concentração efetiva da NVP para inibição em 50% da viabilidade da espécie: o diclofenaco (CE50% 14,04 mg L⁻¹) (CZECH *et al.*, 2014), o metoprolol (CE50% 14,48 mg L⁻¹) (DE GARCÍA *et al.*, 2016), a sertralina (CE50% de 9,2 mg L⁻¹) (MINAGH *et al.*, 2009) e o tenofovir (CE50% de 14,83 mg L⁻¹) (SILVA *et al.*, 2019). Outros apresentaram toxicidade pouco relevante como a carbamazepina (CE50% 78,4 mg L⁻¹) (JOS *et al.*, 2003), ibuprofeno (CE50% 75,19 mg L⁻¹) (DONG *et al.*, 2019) e a azitromicina (EC50% 237,54 mg L⁻¹) (DONG *et al.*, 2019). A grande maioria dos IFAs sofre metabolismo oxidativo. Nesse processo, pode ocorrer a transferência incompleta de pares de elétrons, formando radicais livres que geram as EROs. Entre os organismos estudados, *A. fischeri* foi o mais sensível à presença de NVP. A sensibilidade desse organismo à NVP, em certa medida, pode estar ligada ao complexo sistema bioquímico para produção de energia baseado em um ciclo de reações de transferência de hidrogênio que tem a enzima luciferase como intermediária da reação, que dissipa energia na forma de emissão de luz (MARQUES & SILVA, 2009). Segundo Leitão & Silva (2010), interferências no ciclo de transferência de hidrogênio ou a inibição da enzima luciferase podem comprometer o processo bioluminescência. Nesse sentido, seriam interessantes estudos que pudessem avaliar a atuação de NVP nesses alvos para explicar a toxicidade desse IFA para *A.*

fisheri. Uma possibilidade de mecanismo de ação é o estresse oxidativo, mecanismo inespecífico, que é responsável por muitos dos efeitos adversos de NVP em humanos (DEL VALLE *et al.*, 2013) e que pode ocorrer em outras espécies. A molécula de NVP possui um grupo químico dipiridil que reforça esse argumento; segundo Roede & Miller (2014), essa estrutura é precursora de espécies radicalares no metabolismo oxidativo, funcionando como aceptora de elétrons. Assim, durante o metabolismo oxidativo ocorreria um distúrbio na transferência de elétrons e seriam geradas EROs que induziriam o esgotamento do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) responsável pela proteção celular contra o estresse oxidativo (AWODELE *et al.*, 2015; FERNÁNDEZ *et al.*, 2020), explicando a toxicidade de NVP sobre o ciclo respiratório de *A. fisheri*.

Cabe ressaltar que *A. fisheri* é uma bactéria decompositora, portanto com papel essencial para a ciclagem de nutrientes e para remoção matéria orgânica do meio aquático, nesse sentido, o comportamento de outras espécies bacterianas na presença de NVP é um problema a ser considerado, pois o efeito tóxico do NVP pode ser estendido a outras espécies decompositoras, e dessa maneira os processos de depuração ambiental realizados por esse grupo de organismos podem ser prejudicados (DUNN, 2012).

O teste com *A. fisheri* se mostrou uma ferramenta rápida, simples e altamente aplicável para o monitoramento dos efluentes urbanos e industriais (ABBAS *et al.*, 2018) como indicador da toxicidade aguda de substâncias químicas (PARVEZ *et al.*, 2005).

5.4.4 O efeito da formulação do medicamento sobre a toxicidade do IFA

Para o efeito do medicamento, é necessário que o IFA esteja disponível para ser absorvido. As características biofarmacêuticas do IFA são moduladas pela adição de excipientes (VAN DER MERWE *et al.*, 2020); Os excipientes são considerados inertes do ponto de vista de toxicidade ambiental e são lançados no ambiente em concentrações desconhecidas (ANSES, 2013). Nesse estudo foi observado que a

presença de excipientes da formulação alterou o comportamento das espécies *A. salina* e *A. fischeri* frente à NVP nas condições laboratoriais. Para a espécie *C. vulgaris*, exposta ao IFA e ao medicamento, não foi observada diferença estatisticamente significativa (os intervalos de confiança não estão sobrepostos) entre as concentrações efetivas de NVP que promoveram a inibição de 50% do crescimento da sua biomassa. Por outro lado, a espécie *A. salina* exposta ao medicamento não foi afetada pela NVP, enquanto a espécie *A. fischeri* apresentou inibição da bioluminescência em concentrações efetivas mais baixas de NVP no medicamento. Embora, esses resultados evidenciem que a alteração de fatores abióticos pode favorecer a toxicidade de um IFA no meio ambiente (SHEA, 2004), a presença de excipientes da formulação não alterou o nível de risco de NVP que permanece na categoria III, segundo a GHS (2019).

5.4.5 Os valores de CE10% de NVP e suas implicações

Segundo o OECD (2011), a CE10% é um valor estatístico mais apropriado para medir o efeito sobre as espécies porque se aproxima da concentração na qual nenhum efeito é observado (NOEC). As CE10% para o IFA e para o medicamento apresentaram diferenças estatísticas para as espécies estudadas, o que indica que o IFA e o medicamento possuem NOEC diferentes. A presença de excipientes pode alterar fatores abióticos do meio de cultura e promover efeitos mais sutis em concentrações mais baixas de NVP. No entanto, cabe ressaltar que a razão entre os valores da CE50% e da CE10% para ambos, IFA e medicamento foi próxima a dois, indicando uma janela estreita entre a concentração em que são observados os primeiros efeitos e a concentração que promove efeitos inibitórios significativos sobre os processos metabólicos das espécies estudadas.

5.4.6 Possíveis efeitos ambientais do IFA e do medicamento à base de NVP

Em alguns locais em que foi consumida, detectou-se a presença de NVP em diferentes matrizes ambientais. Uma concentração de 177 ng L⁻¹ foi detectada nos rios e barragens na África do Sul (WOOD *et al.*, 2015). A concentração de 410 ng L⁻¹

foi detectada nas águas subterrâneas no Ried e Ruhr Hessian na Alemanha (NGUMBA *et al.*, 2016). O monitoramento de NVP no Rio Nairóbi no Quênia, país de alto consumo de medicamentos ARV à base de NVP, mostrou aumento da concentração máxima detectada, passando de 510,0 ng L⁻¹ (K'OREJE *et al.*, 2012) para 1600 ng L⁻¹ (K'OREJE *et al.*, 2016). Segundo os autores, os níveis de concentração desse MP detectados nas matrizes testadas estavam correlacionados com a quantidade de medicamentos contendo NVP consumidos pela população local, com a adequação das condições sanitárias e com a comprovada ineficiência das estações convencionais de tratamento de água e esgoto para remover NVP (NGUMBA *et al.*, 2016; PRASSE *et al.*, 2010; K'OREJE *et al.*, 2012).

Com base no exposto, torna-se importante ressaltar que embora a CE10% e a CE50% sejam muito superiores às concentrações ambientais detectadas em locais com alta prevalência de uso de NVP, esses parâmetros são importantes para comparar os efeitos dos xenobióticos sobre as espécies e para estimar o risco deles para os diferentes estratos do ecossistema aquático. Ademais, a NVP não é um contaminante exclusivo nesses locais, é lançada continuamente a partir dos excretas humanos, é resistente à degradação e suas propriedades biofarmacêuticas favorecem seu transporte não difusivo e sua acumulação no ambiente, portanto não se pode negligenciar seu risco de afetar ecossistemas locais.

Segundo Rodrigues *et al.* (2018), a maioria dos estudos sobre MP são realizados pelos Estados Unidos da América, Inglaterra e Holanda, daí a contribuição desse estudo acerca da toxicidade de IFAs e medicamentos para incentivar a busca de conhecimentos mais avançados sobre um assunto que carece de investimento e apoio em especial em países em desenvolvimento.

Embora tenha sido realizado em laboratório, em condições padronizadas, utilizando substâncias de composição e pureza conhecidas, menos complexas que a matriz ambiental, é importante destacar alguns aspectos dos resultados obtidos na avaliação do IFA e do medicamento. O primeiro deles é que os resultados do estudo, em termos de CE50% convergiram em torno da concentração de 20 mg L⁻¹

de NVP, para os organismos testados apesar dos diferentes níveis de organização e complexidade celular. O segundo é que a presença de excipientes pode explicar as diferenças entre os valores obtidos para as concentrações efetivas do IFA e do medicamento para cada espécie conforme já observado nos estudos de Pavlaki *et al.* (2011), Silva *et al.* (2014) e Jacob *et al.* (2016), porém é necessário aprofundar nessa questão.

Pode ser apontado como um dos fatores limitantes deste estudo, a execução dos ensaios em condições controladas, o que não acontece em ambiente real. Assim, os efeitos adversos do NVP para organismos aquáticos podem ser alterados pelas múltiplas interações nesse ambiente. No entanto, a validade dos resultados obtidos está no desenho do estudo certificando a concentração real da NVP à que foram expostos os organismos nos meios de cultura e a aplicação de protocolos internacionalmente aceitos que permitiram confirmar a categorização de risco para o ambiente aquático e contribuir para o estudo de toxicidade de matrizes mais complexas contendo NVP.

5.5 Conclusão

Concluiu-se que o conhecimento de seus efeitos ambientais tóxicos de NVP se somam aos dos demais micropoluentes e que, nesse sentido é possível avançar com estudos toxicidade ambiental como forma de conhecer e dimensionar o risco ambiental decorrente da produção industrial e do consumo humano de medicamentos. Por fim, conclui-se também que o monitoramento da toxicidade ambiental desses MP é passível de implementação na rotina laboratorial, utilizando testes de toxicidade padronizados e economicamente acessíveis, que oferecem rapidez e praticidade na análise de efluentes.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento de Minas Gerais - FAPEMIG (processo n. CEX-APQ-01626-14). Os autores

agradecem aos professores Doutora Liséte Celina Lange e Doutora Raquel Sampaio Jacob da Faculdade de Engenharia da UFMG pela colaboração nesse estudo. Além disso, agradecemos à equipe do Controle de Qualidade e Desenvolvimento de Medicamentos da Funed. Também agradecemos ao Luiz Gustavo de Oliveira Schenk, pela revisão gramatical dos idiomas inglês e espanhol (resumo/abstract).

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Declaração de financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento de Minas Gerais - FAPEMIG (processo n. CEX-APQ-01626-14).

Referências

Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Tahir, M. A. & Iqbal M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci. Total Environ.* 626: 1295-1309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>

Amarante, C. B., Müller, A. H., Póvoa, M. M. & Dolabela, M. F. (2011) Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica.* 41, 3, 431-434. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>

ANSES - Agence Nationale de Securite Sanitaire. (2013). National analysis campaign on drug residues in water intended for human consumption. Retrieved May 6, 2020, from www.anses.fr/en/content/national-analysis-campaign-drug-residues-water-results-line-expectation.

Awodele, O., Popoola, T., Rotimi, K., Ikumawoyi, V. & Okunowo, W. (2015). Antioxidant modulation of nevirapine induced hepatotoxicity in rats. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(1), 8–14. DOI: <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0002>

BIO Intelligence Service. (2013). Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers.

Boehringer Ingelheim, Vetmedica. Safety data sheet United States nevirapine. Version 1. (2015). Retrived 2020, from <https://www.bi-vetmedica.com/sites/default/files/MSDS/nevirapine-sds-us.pdf>

Boehringer Ingelheim, Viramune® (nevirapine) Tablets/Viramune® (nevirapine) oral suspension, U.S. prescribing information. (2019) Retrived 2020, from <https://docs.boehringer-ingelheim.com/Prescribing%20Information/PIs/Viramune/Viramune.pdf>

Boxall, A. B. A., Keller, V. D. J., Strau, J. O., Monteiro, S. C., Fussell, R. & Williams, R. J. (2014). Exploiting monitoring data in environmental exposure modelling and risk assessment of pharmaceuticals. *Environment International*, 73: 176-185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.018>.

Costa, C. R., Olivi P., Botta, C. M. R. & Espindola, E. L. G. (2008). Toxicity in aquatic environments: Discussion and evaluation methods. *Química Nova*, 31: 1820-1830. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

Czech, B., Joško, I. & Oleszczuk, P.(2014). Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 247-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.024>

Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C., & Pröschold, T. (2019). Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. *Systematics and Biodiversity*, 17(8), 811–829. DOI: <https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1690597>

Das, K., Martinez, S. E., Bauman, J. D. & Arnold, E. (2012). HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19: 253–259. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2223>

de García, S. O., García-Encina, P. A. & Irusta-Mata, R. (2016). Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. *Ecotoxicology*, 25: 141– 790 162. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1576-8>

del Valle, L. G., Hernández, R. G. & Ávila, J. P. (2013). Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology & Microbiology*, 2013, 279685, 15. DOI: <https://doi.org/10.5171/2013.279685>

Dong, Y., Fang, Z., Xu, Y., Wang, Q. & Zou, X. (2019). The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*. *Emerg. Contam.* 5: 297-302. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.08.004>

Du, J., Yuan, Y., Si, T., Lian, J. & Zhao, H. (2012). Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. *Nucleic Acids Research*, 40: 142. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks549>

Dunn, A. K. (2012). *Vibrio fischeri* metabolism: symbiosis and beyond. *Advances in microbial physiology*, 61: 37–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>

Fernández, L. P., Brasca, R., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C. & Culzoni, M. J. (2020). Bioaccumulation and glutathione S-transferase activity on *Rhinella arenarum* tadpoles after 813 short-term exposure to antiretrovirals. *Chemosphere*, 246. 125830 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125830>

Geiger, E., Hornek-Gausterer, R.; SAÇAN, 2016, R. H. & Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129: 189-198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.032>

UNITED NATIONS. **GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals**. 8th Revised Edition, United Nations, New York, 2019. E-book. Disponível em: <<https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en>>

González, M. A., Proschold, T., Palacios, Y., Aguayo, P., Inostroza, I., & Gomez, P. I. (2013). Taxonomic identification and lipid production of two Chilean *Chlorella*-like strains isolated from a marine and an estuarine coastal environment. *AoB Plants*, 5(0), plt020–plt020. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt020>

González-González, R. B., Sharma, A., Parra-Saldívar, R., Ramirez-Mendoza, R. A., Bilal, M. & Iqbal, H. M. N. (2022). Decontamination of emerging pharmaceutical pollutants using carbon-dots as robust materials. *J Hazard Mater.* 5; 423 (Pt B):127145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127145>.

Gupta, B. P., Lama, T. K., Adhikari, A., Shrestha, A., Rauniyar, R., Sapkota, B., Thapa, S., Shrestha, S., Gupta, P. P. & Manandhar, K. D. (2016). First report of hepatitis E virus viremia in healthy blood donors from Nepal. *Virus Disease*, 27: 324–326. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-016-0331-y>

Hube, S. & Wu, B. (2021) Mitigation of emerging pollutants and pathogens in decentralized wastewater treatment processes: A review, *Science of The Total Environment*, 779,146545. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146545>

Hulgan, T., Morrow, J., D'Aquila, R. T., Raffanti, S., Morgan, M., Rebeiro, P. & Haas, D. W. (2003). Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 37:1711–7. DOI: <https://doi.org/10.1086/379776>

ISO 11348-3. (2007) *Water quality – determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of Vibrio fischeri (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria*. Geneva. International Organization for Standardization.

Jacob, R. S., Santos, L. V., Souza, A. F. & Lange, L. C. (2016). A toxicity assessment of 30 pharmaceuticals using *Aliivibrio fischeri*: a comparison of the acute effects of different formulations. *Environmental technology*, 37: 2760-2767. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1164249>

Jain, V., Hartogensis, W., Bacchetti, P., Hunt, P. W., Hatano, H., Sinclair, E., Epling, L., Lee, T. H., Busch, M. P., McCune, J. M., Pilcher, C. D., Hecht, F. M. & Deeks, S. G. (2013). Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J. Infect. Dis*, 208: 1202–1211. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit311>.

Jos, A., Repetto, G., Rios, J. C., Hazen, M. J., Molero, M. L., del Peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Pérez-Martín, J. M. & Cameán A. (2003). Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro*, 17: 525-532. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00119-X)

Kaiser, L. E. (1998). Correlations of vibrio fischeri bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Perspectives*, 106 (2). 583-591. Doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.98106583>

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. & Bolton, E. E. (2019). PubChem 2019 update: improved access to chemical 871 data. *Nucleic acids research*, 47: 1102-1109. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>

K'oreje, K. O., Demeestere, K., De Wispelaere, P., Vergeynst, L., Dewulf, J., Van Langenhove, H. (2012). 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*. 437: 153-164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.052>

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: 238-244. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.095>

Kroeger Smith, M. B., Rouze, C. A., Taneyhill, L. A., Smith, N. A., Hughes, S. H., Boyer, P. L., Janssen, P. A. J., Moereels, H., Koymans, L., Arnold, E., Ding, J., Das, K., Zhang, W., Michejda, C. J. & Smith Jr, R. H. (1995). Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors: Total energy of complexation

as a predictor of drug placement and activity. *Protein Science*, 4:2203-2222. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.5560041026>

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75: 417-434. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.Chemosphere.2008.11.086>

Leitão, J. M. M. & Silva, J. C. G. E. (2010). Firefly luciferase inhibition. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101: 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.015>

Li, T., Xu, G., Rong, J., Chen, H., He, C., Giordano, M., Wang, Q. (2016). The acclimation of *Chlorella* to high-level nitrite for potential application in biological NO_x removal from industrial flue gases. *Journal of Plant Physiology*, 195: 73-79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.006>

Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69: 35-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>

Lu, Y., Xu, X., Meng, C., Zhou, J., Sheng, J., Wu, C. & Xu, S. (2013). The toxicity assay of *Artemia salina* as a biological model for the preliminary toxic evaluation of chemical pollutants. *Advanced Materials Research*, 726–731, 230–233. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.726-731.230>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S. & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473-474, 619–641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>.

Marques, S. M. & Silva, J. C. G. E. (2009). Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*, 61: 6-17. DOI: <https://doi.org/10.1002/iub.134>

Martins, A. C. R., da Costa, J. K. N., Herbert, A., Farias, F. R. S., Rezende, M., Kozłowski Junior, V. A. & de Geus, J. L. (2021) Toxicity assessment of mastic and pomegranate tinctures using the *Artemia salina* bioassay. *Research, Society and Development*, [S. I.], 10, 3, e5201031375. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13751>.

Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D. & McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45: 31–34. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

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: 434–440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.002>

Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H. & Halm-Lemeillz, M. P. (2016). Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 4992–5001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3662-5>

Ngumba, E., Gachanja, A. & Tuhkanen, T. (2016). Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. *Science of the Total Environ*, 539: 206–213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>

Nie, X., Wang, X., Chen, J., Zitko, V. & An T. (2008). Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 168-173. DOI: <https://doi.org/10.1897/07-028.1>

Nunes-Halldorson, V. S. & Duran, N. L. (2003). Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 91-96. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200001>

Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M. & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental pollution*, 144: 453–462. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>

Oliveira, G. A. R., Leme, D. M., de Lapuente, J., Brito, L. B., Porredón, C., Rodrigues, L. B., Brull, N., Serret, J. T., Borràs, M., Disner, G. R., Cestari, M. M. & Oliveira, D. P. (2018). A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. *Chem Biol Interact.* 1;291:171-179. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.026>.

Onbasili, D. & Duman, F. (2010). Acute toxicity of some insecticides on *Artemia salina* and *Daphnia magna*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 19 (11): 2608-2610

Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD. (2011). Guidelines for testing chemicals freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. 201. Retrived from <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069923-en.pdf?exp=1>

Parvez, B. S., Venkataraman, C. & Mukherji, S. (2005). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32, 265 – 268. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022>

Pavlaki, M. D., Pereira, R., Loureiro, S. & Soares, A. M. (2011). Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74: 99–110. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.010>

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: 1728-1735. Doi: <https://doi.org/10.1021/es903216p>

Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M. & Naji, T. (2015) *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU J Pharm Sci* 23, 20. Doi: <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>

Ribo, J. M. (1997). Interlaboratory Comparison Studies of the Luminescent Bacteria Toxicity. Bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12(4), 283–294. Retrived 2020, from https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902141905826462

Rippka, R., Deruelles, J. & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of sant General Microbiology*, 111: 61. Doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE*, 10: e0146021. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

Rodrigues, M. O., Gonçalves, A. M. M., Gonçalves, F. J. M., Nogueira, H., Marques, J. C. & Abrantes, N.(2018). Effectiveness of a methodology of microplastics isolation for environmental monitoring in freshwater systems, *Ecological Indicators*, 89: 488-495, ISSN 1470-160X. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.02.038>.

Roede, J. R. & Miller, G. W. 2014. Diquat. *Encyclopedia of Toxicology*, 2. 202-204. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00137-8>

Shea, D. (2004). Transport and Fate of Toxicants in the Environment. *A Textbook of Modern Toxicology*, 479–499. Doi: <https://doi.org/10.1002/0471646776.ch27>

Silva, A., Santos, L. H., Delerue-Matos, C.& Figueiredo, A. S. 2014. Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*. *Environmental technology*, 35: 3124-3129. Doi: <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.932438>

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: 1565-1577. Doi: <https://doi.org/10.4236/jep.2019.1012093>

Stewart, M., Olsen, G., Hickey, C. W., Ferreira, B., Jelić, A., Petrović, M., & Barcelo, D. (2014). A survey of emerging contaminants in the estuarine receiving environment around Auckland, New Zealand. *Science of The Total Environment*, 468-469, 202–210. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.039>:

van der Merwe, J., Steenekamp, J., Steyn, D. & Hamman, J. (2020). The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug

Dissolution and Bioavailability. Pharmaceutics, 12, 393. Doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050393>

Vaňková, M. (2010). Biodegradability analysis of pharmaceuticals used in developing countries; screening with OxiTop® - C 11073f., Doctoral thesis. Tampere University of Applied Sciences, Finland

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - a review. *Science of the total environment*, 429, 123-155. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>

Wang, L., Wang, H., Chen, X., Zhuang, Y., Yu, Z. & Zhou, T. (2018). Acclimation process of cultivating *Chlorella vulgaris* in toxic excess sludge extract and its response mechanism. *The Science of the total environment*, 628-629, 858–869. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.020>

Weyman, G. S., Rufli, H., Weltje, L., Salinas, E. R. & Hamitou, M. (2012). Aquatic toxicity tests with substances that are poorly soluble in water and consequences for environmental risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*, 31: 1662–1669. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.1856>

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. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>

Zakrzewski, S. F. (2002). *Environmental toxicology*. Oxford University Press. ISBN-13: 9780195148114

6 ESTUDO II: “Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do ingrediente ativo farmacêutico nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina sobre a espécie vegetal *Allium cepa*”

Resumo

A nevirapina (NVP) é um antirretroviral inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo. A toxicidade do ingrediente ativo farmacêutico (IFA) nas concentrações analíticas $6,42 \pm 0,58$ (A); $9,54 \pm 0,87$ (B) e $17,73 \pm 1,31$ mg/L(C) e do medicamento à base de NVP nas concentrações $5,48 \pm 0,44$ (A); $11,20 \pm 1,13$ (B) e $17,68 \pm 1,29$ (C) mg/L foram avaliadas em condições de laboratório, usando como modelo de sementes da espécie vegetal *Allium cepa*. Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da comparação dois a dois de Mann Whitney para dados não paramétricos, no software gratuito R, versão 4.0.3, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O índice de germinação (IG) do controle negativo (CN) foi de $86,8 \pm 2,1$ e do metilmetanossulfonato (MMS) foi de $91,8 \pm 1,9$. As concentrações A e B do IFA e B do medicamento à base de NVP apresentaram IGs estatisticamente maiores que o CN (IGs $95,2 \pm 2,5$; $p 0,0284$; $95,2 \pm 2,5$; $p 0,0294$ e $96,8 \pm 2,6$; $p 0,0284$, respectivamente) e similares ao MMS. Observou-se que na concentração A do medicamento à base de NVP, houve cerca de 10% de inibição da germinação (IG $79,8 \pm 2,1$; $p 0,0284$) quando comparado ao CN. As concentrações C do IFA e do medicamento apresentaram IGs similares ao CN. Verificou-se que o crescimento radicular (CR) do CN foi $1,7 \pm 0,6$ mm e que nas concentrações B e C do IFA e todas do medicamento, os CRs foram estatisticamente inferiores ao controle negativo (CRs $1,5 \pm 0,6$ mm; $p 0,0108$; $1,4 \pm 0,6$ mm; $p 0,0180$; $1,3 \pm 0,6$ mm; $p 0,0002$; $1,4 \pm 0,5$ mm; $p 0,0017$ e $1,4 \pm 0,6$ mm; $p 0,0000$, respectivamente). Na concentração A do IFA, o CR de $1,7 \pm 0,5$ foi similar ao CN. O índice mitótico (IM) do CN e do MMS foram $7,4 \pm 2,7$ e $12,8 \pm 4,5$, respectivamente. Na concentração C do medicamento à base de NVP, o IM de $12,7 \pm 2,7$ foi estatisticamente maior que o CN ($p 0,0029$) e similar ao MMS, indicando que nessa concentração a NVP foi citotóxica. Os índices de anormalidades cromossômicas (IACs) do CN, MMS e TFL foram $0,2 \pm 0,4$; $0,9 \pm 2,1$ e $1,0 \pm 3,3$, respectivamente. Os IACs de todas as concentrações testadas foram estatisticamente maiores que o CN, sugerindo que a NVP foi genotóxica. O índice de mutagenicidade (IMT) do CN foi $0,2 \pm 0,3$. Nas concentrações A, B e C do IFA e C do medicamento à base de NVP, os IMTs foram estatisticamente maiores que o CN (IMTs $1,8 \pm 1,4$; $p 0,0013$; $1,3 \pm 0,9$; $p 0,0017$; $1,0 \pm 0,8$; $p 0,0003$; $0,5 \pm 0,3$; $p 0,0237$, respectivamente), indicando que nessas concentrações a NVP foi mutagênica para *A. cepa*. A aderência cromossômica foi a aberração cromossômica mais frequente nos grupos expostos à NVP, sugerindo que ela tenha um efeito aneugênico para a espécie *A. cepa*. Conclui-se que a redução da presença de NVP no ambiente possa mitigar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos demonstrados para *A. cepa* e que podem ameaçar outras espécies. Apesar dos resultados terem sugerido que a NVP atue por mecanismo de ação aneugênico, estudos são necessários para confirmar seu mecanismo de ação na espécie *A. cepa*.

Palavras-chave: nevirapina; *Allium cepa*; citotoxicidade; genotoxicidade, mutagenicidade; índice mitótico.

Abstract

Nevirapine (NVP) is an antiretroviral non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. The toxicity of the active pharmaceutical ingredient (API) at analytical concentrations 6.42 ± 0.58 (A); 9.54 ± 0.87 (B) and 17.73 ± 1.31 mg/L (C) and NVP-based drug at concentrations 5.48 ± 0.44 (A); 11.20 ± 1.13 (B) and 17.68 ± 1.29 mg/L (C) were evaluated in laboratory conditions, using *Allium cepa* as a seed model. The Shapiro-Wilk normality test was applied, followed by the Mann Whitney two-by-two comparison for non-parametric data, using the free software R, version 4.0.3, with a confidence interval of 95% ($p < 0.05$). The germination index (GI) of the negative control (NC) was 86.8 ± 2.1 and that of the methylmethanesulfonate (MMS) was 91.8 ± 1.9 . The concentrations of A and B of the API and B of the NVP-based drug showed GIs statistically higher than the CN (GIs 95.2 ± 2.5 ; $p 0.0284$; 95.2 ± 2.5 ; $p 0.0294$ and 96.8 ± 2.6 ; $p 0.0284$, respectively) and similar to MMS. It was observed that at a concentration A of the drug based on NVP occurred about 10% inhibition of germination (GI 79.8 ± 2.1 ; $p 0.0284$) when compared to NC. The concentrations of C of the API and of the drug showed GIs similar to NC. It was found that the root growth (CR) of NC was 1.7 ± 0.6 mm and that at concentrations of B and C of API and all of the drug, the CRs were statistically lower than the negative control (CRs 1.5 ± 0.6 mm; $p 0.0108$; 1.4 ± 0.6 mm; $p 0.0180$; 1.3 ± 0.6 mm; $p 0.0002$; 1.4 ± 0.5 mm; $p 0.0017$ and 1.4 ± 0.6 mm; $p 0.0000$, respectively). At the concentration A of API, the CR of 1.7 ± 0.5 was similar to the NC. The mitotic index (MI) of NC and MMS were 7.4 ± 2.7 and 12.8 ± 4.5 , respectively. At the concentration C of the NVP-based drug, the MI of 12.7 ± 2.7 was statistically higher than the NC ($p 0.0029$) and similar to the MMS, which indicated that at this concentration NVP was cytotoxic. The indices of chromosomal abnormalities (IACs) of NC, MMS and TFL were 0.2 ± 0.4 ; 0.9 ± 2.1 and 1.0 ± 3.3 , respectively. At all concentrations, the IACs were statistically higher than CN, suggesting that NVP was genotoxic. The mutagenicity index (IMT) of CN was 0.2 ± 0.3 . At concentrations A, B and C of API and C of NVP-based drug, IMTs were statistically higher than CN (IMTs 1.8 ± 1.4 ; $p 0.0013$; 1.3 ± 0.9 ; $p 0.0017$; 1.0 ± 0.8 ; $p 0.0003$; 0.5 ± 0.3 ; $p 0.0237$, respectively), indicating that at these concentrations NVP was mutagenic for *A. cepa*. Chromosomal adherence was the most frequent chromosomal aberration in the groups exposed to NVP, suggesting that it has an aneugenic effect for the species *A. cepa*. It is concluded that the reduction of the presence of NVP in the environment can mitigate the possible cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects demonstrated for *A. cepa* and that can threaten other species. Although the results have suggested that NVP acts by an aneugenic mechanism of action, studies are needed to confirm its mechanism of action in *A. cepa* species.

Keywords: nevirapine; *Allium cepa*; cytotoxicity; genotoxicity; mutagenicity; mitotic index.

6.1 Introdução

A nevirapina (NVP) é um antirretroviral da classe dos inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeo (INNTR) usado na terapia combinada para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). É um ingrediente ativo farmacêutico (IFA) utilizado na fabricação de medicamentos utilizados por cerca de trinta e cinco por cento da população mundial, especialmente em países de baixa renda, como uma das opções terapêuticas disponíveis a baixo custo (THE TENORES STUDY GROUP, 2015). A NVP age na via metabólica responsável pela transcrição do DNA, inibindo a transcriptase reversa (TR) e impedindo a multiplicação do vírus.

A transcriptase reversa, também chamada de DNA-polimerase dependente do ácido ribonucleico (RNA), é uma enzima encontrada em retrovírus, como o HIV (MARTÍN-ALONSO *et al.*, 2022). Essa enzima é responsável pela polimerização do DNA, a partir do RNA viral lançado no citoplasma da célula infectada (MUKHERJEE *et al.*, 2021). Em humanos, essa função é desempenhada pelas DNA-polimerases que, apesar da similaridade funcional, parece não ser inibida em doses terapêuticas pela NVP, indicando uma seletividade da ação do IFA sobre a inibição da enzima viral (DE CLERCQ, 1993). Nas demais espécies, existem enzimas similares à DNA-polimerases que desempenham essa mesma função, porém pouco se sabe sobre o efeito de NVP sobre outras espécies.

A NVP é uma dipiridodiazepiona (KIM *et al.*, 2019) que possui a estrutura química dipiridil, presente também em alguns herbicidas como o Diquate® (9,10-diidro-8a,10a-diazoniafenatreno ou 6,7-diidro-dipirido[1,2-a:2',1'-c]pirazina-5,8-diium). Essa estrutura é precursora de espécies radiculares que funcionam como aceptoras de elétrons no metabolismo oxidativo (ROEDE; MILLER, 2014). Ao induzir o metabolismo oxidativo, tais espécies levam à injúria tecidual pela capacidade de provocar depleção do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH), a peroxidação lipídica e alteração do potencial de membrana (GUO *et al.*, 2020).

Em geral, espécies radicalares podem induzir alterações cromossômicas, romper a dupla fita do DNA e, na ausência de catalisadores, oxidar grupos sulfidríla (ALKADI, 2020). O potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de NVP merece ser avaliado sobre outras espécies, pois há evidências de que alguns efeitos adversos do fármaco estão associados ao estresse oxidativo em humanos (DEL VALLE *et al.*, 2013), que pode desencadear a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), quando se observa a estrutura química presente na molécula de NVP (LIANG *et al.*, 2020).

Além disso, a NVP é um IFA pouco solúvel em água (90 mg/L), com alta lipofilicidade e muito estável frente à incidência de luz e calor (KIM *et al.*, 2019), apresentando baixa biodegradabilidade ambiental (NYIRENDA *et al.*, 2020). Assim, tais características aumentam as chances da presença de frações não dissolvidas desse IFA na água, no solo e nos sedimentos, tal como sua persistência em locais onde há uma infraestrutura hidrossanitária ausente ou inadequada para o tratamento de resíduos (ADEOLA; FORBES, 2021; WALENGAB; NOMNGONGO, 2022).

Em países com alta prevalência de pessoas vivendo com HIV (PVHIV), estudos ambientais identificaram a presença de resíduo de NVP em águas superficiais, em concentrações de 0,5 a 1,5 µg/L (ADEOLA; FORBES, 2021; K'OREJE *et al.*, 2012) e 1480 ng/L e em sedimentos, com concentrações de 9,5 µg/L na fração dissolvida e 3214 µg/Kg na fração não dissolvida (KAIRIGO *et al.*, 2020). Além disso, foi confirmado que cerca 100 µg/Kg de NVP persiste nos sedimentos dos rios africanos após o processo de tratamento de água e de efluentes, indicando que a concentração residual e não metabolizada pode alcançar o ambiente continuamente e contaminar o solo e a água (NGUMBA; GACHANJA; TUHKANEN, 2016; NGUMBA, 2018)

A presença desse resíduo no ambiente pode contribuir para o desequilíbrio ambiental de inúmeras espécies e prejuízo à saúde humana. A contaminação com micropoluentes (MP) como os IFAs é alvo de preocupações da Organização Mundial

de Saúde (OMS) em relação ao uso humano de plantas medicinais no mundo. Embasados nessas informações, Akenga *et al.* (2021) estudaram a absorção vegetal de moléculas de IFAs antirretrovirais e antivirais, entre eles a NVP, usando sementes de alface hidropônica (*Lactuca sativa*). Os autores usaram um extrato metanólico de NVP (100 mg/L) e evidenciaram valores de 0,08 mL/g e 0,025 mg/g, respectivamente como fator de concentração na raiz (FCR) e fator de bioconcentração (FBC). Nesse estudo também foi demonstrado que a tendência da NVP é ser transportada para as folhas, não se acumulando nas raízes dentro da planta.

Tendo em vista o desconhecimento dos efeitos sobre as gerações futuras e com base nos inúmeros efeitos adversos descritos na literatura em crianças expostas aos antirretrovirais (ARV) no período perinatal, os autores Onwuamah *et al.* (2014) propuseram comparar os efeitos genotóxicos do xarope de NVP e de zidovudina (AZT). Para tanto, elegeram a espécie vegetal *Allium cepa* (FISKEJO, 1993; 1994) como modelo de estudo como uma alternativa à dificuldade metodológica e aos conflitos bioéticos para a realização de ensaios de citogenotoxicidade em modelos animais.

De fato, o ensaio com *A. cepa* é consolidado na literatura para avaliação da genotoxicidade de compostos químicos (BONCIU *et al.*, 2018; PARVAN *et al.*, 2020), plantas medicinais (CAMPAROTO *et al.*, 2002; KNOLL *et al.*, 2006; BAGATINNI; SILVA; TESDESCO, 2007; DOS REIS *et al.* 2020; CARMO; LEAL; RIBEIRO, 2020; GUEDES *et al.*, 2018; NEVES; OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2020) e fármacos (GRISOLIA; TAKAHASHI, 1990; RAJI; ONWUAMAH; ODEIGAH., 2018), apresentando sensibilidade e boa correlação quando comparado com outros sistemas, como por exemplo, com mamíferos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse modelo tem sido amplamente utilizado para monitoramento de bacias (RODRIGUES; DALZUCHIO; GEHLEN, 2016), de poluentes ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; LEME; DE ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SOODAN; KATNORIA; NAGPAL, 2014) e efluentes industriais (LEME; MARIN-

MORALES, 2008a; 2008b; MATSUMOTO et al.; 2006; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

Diferentemente dos estudos de Onwuamah *et al.* (2014) e Akenga *et al.* (2021), a proposta desse estudo foi avaliar apenas o ARV nevirapina e utilizar o modelo ambiental *A. cepa*, porém, substituindo-se os bulbos de cebola por sementes, para melhorar a padronização das condições de teste e do organismo-teste, aumentar o n amostral e reduzir o espaço de teste, facilitando o manuseio e a replicação do teste na rotina laboratorial.

Neste estudo, primeiramente, avaliou-se a citotoxicidade a partir da germinação de sementes e, em seguida, avaliou-se o crescimento da radícula emergente da semente. As avaliações do crescimento radicular e do índice mitótico foram similares às aquelas realizadas por Onwuamah *et al.* (2014), diferindo-se deste autor pela utilização de radículas emergentes da semente, realização do teste estático e sem reposição de meio, sem período de recuperação, maior tempo de exposição e utilização de concentrações do IFA e do medicamento diferentes em ensaios simultâneos. Similarmente, foram avaliadas as aberrações cromossômicas. Foram segregadas as observações das alterações nucleares entre as células da região meristemática e da região de alongamento da raiz (F1), possibilitando a avaliação da mutagenicidade na região F1, complementando os estudos daqueles autores. Ressalta-se que neste estudo foram avaliados os efeitos de NVP, comparando-se isoladamente o IFA e o medicamento a base de NVP e estes com os efeitos do agente alquilante metilmetanossulfonato (MMS) e do herbicida trifluralina (TFL).

Nesse sentido, no presente estudo teve-se como objetivo investigar o potencial efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico do ingrediente ativo farmacêutico NVP e de um medicamento à base de NVP sobre o modelo experimental *A. cepa*, a fim de contribuir com diferentes respostas sobre o impacto da presença desse resíduo no meio ambiente.

6.2 Materiais e Métodos

Para condução deste estudo, utilizou-se a metodologia do estudo de Caritá, Mazzeo e Marin-Morales (2019) adaptada para as condições laboratoriais, padronizando-se as variáveis experimentais como: (i) uso de sementes, (ii) preparo de soluções, (iii) forma de exposição, (iv) tempo de ensaio, (v) fixação de radículas, (vi) preparo e a coloração de lâminas com os cortes histológicos e (vii) preparo de lâminas permanentes.

6.2.1 Substâncias químicas

Utilizou-se o IFA NVP na forma anidra, (lote C5028-12009M), com teor de pureza de 100,49%, fabricado pela Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd (Linhai, China). Para os testes com o medicamento, foram pulverizados comprimidos do produto Nevirax® 200 mg (lote 14030011) com teor de pureza de 100,20%, fabricado pela Fundação Ezequiel Dias (Funed) (Belo Horizonte, Brasil). O padrão analítico utilizado foi a substância química de referência (SQR) NVP anidra (lote G0M270), da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP). Os reagentes metilmetanossulfonato (MMS) (Sigma-Aldrich, 66-27-3), trifluralina (TFL) (Sigma-Aldrich, 1582-09-8) e as soluções reagentes de Carnoy, carmim acético 1 % e reagente de Schiff foram fornecidos pelo Laboratório de Saúde Pública/Águas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para todas as etapas de preparação, os reagentes e solventes utilizados neste estudo foram grau analítico e com certificado de aprovação do controle de qualidade da Funed.

6.2.2 Soluções, suspensões e reagentes

Uma solução padrão estoque foi preparada com 15,82 mg da SQR NVP anidra, solubilizada em um balão volumétrico de 25 mL, contendo 10 mL de acetonitrila e 15 mL de água purificada (Millipak® 20 millipore Direct – Q® 3UV). A partir desta solução, três outras soluções padrão de trabalho de NVP foram preparadas nas concentrações de 12,66 mg/L, 31,64 mg/L e 63,28 mg/L para a curva de calibração.

Para os ensaios, foram preparadas uma solução e uma suspensão de estoque, respectivamente, do IFA e do medicamento para se obter, após diluição, soluções e suspensões de trabalho nas concentrações de 5 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L de NVP em água purificada, tendo seu pH ajustado para $6,9 \pm 0,1$. Tais concentrações são próximas a 10 mg/L, similar à concentração plasmática de NVP encontrada em humanos (VIRAMUNE, 2019). Para os controles positivos foram preparadas uma suspensão aquosa de TFL (0,019 ppm) (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009) e uma solução aquosa de MMS (4×10^{-4} mol/L) (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) e para o controle negativo foi utilizada água purificada com pH ajustado de $6,9 \pm 0,1$.

6.2.3 Corantes para confecção de lâminas permanentes

Seguindo o protocolo de Caritá, Mazzeo e Marin-Morales (2019) com adaptações, o fixador de Carnoy foi preparado com etanol 99% p.a e ácido acético glacial na proporção de 3:1 (v/v) de uso imediato para a fixação e conservação das radículas. O carmim acético 1% foi preparado a partir da solubilização de 1 g de carmim em 100 mL de ácido acético 45%, seguida de um processo de fervura por duas a três horas e filtração. Para o reativo de Schiff, 1,5 g de fucsina básica e 4,5 g de metabissulfito de sódio foram solubilizados, sob agitação, em 300 mL água aquecida (50 °C) e 45 mL de ácido clorídrico 1 mol/L. Em seguida, a solução foi aquecida e agitada por quinze minutos e armazenada ao abrigo da luz por 24 horas. Após repouso, foi adicionado 1 g de carvão ativado à solução e a mesma foi filtrada, separando-se alíquotas de 10 mL em frasco com conta gotas. Por fim, as alíquotas

foram armazenadas na geladeira em frasco escuro, envolto por papel alumínio e mantido ao abrigo da luz. Para cada dia de trabalho, uma nova alíquota do reativo foi utilizada.

6.2.4 Determinação analítica de NVP

Para determinação da concentração analítica de NVP, no tempo inicial do teste, uma alíquota de três mL de cada amostra solução/suspensão de trabalho (IFA e medicamento à base de NVP) foi filtrada em filtro de 0,45 µm e transferida para tubos Falcon para posterior quantificação por cromatografia líquida de ultraeficiência (UHPLC) (Shimadzu Nexera-Prominence®) acoplado ao detector de fotodiodo (modelo SPD-M20A), ambos Shimadzu (Columbia, USA), utilizando o método analítico nas condições cromatográficas descritas por Diniz *et al.* (2022). A separação foi feita utilizando uma coluna C18 2,0 × 100 mm e diâmetro de partícula de 2,2 µm (ShimPack XR® UHPLC). O pico de NVP foi monitorado em 214 nm e eluiu após 11 minutos do início da corrida.

6.2.5 Organismo-teste

No trabalho foram utilizadas sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme), lote 42011-52, da ISLA PAK, índice de germinação de 89% e pureza de 100% adquirida no comércio varejista de Belo Horizonte, Sudeste do Brasil.

6.2.6 Teste de germinação de sementes

Foi utilizado a metodologia do teste de Christofolletti, Francisco e Fontanetti (2012), adaptado, utilizando-se 25 sementes de *A. cepa* expostas continuamente a quatro mL da solução/suspensão de trabalho do IFA ou do medicamento à base de NVP em cada placa de Petri previamente autoclavada e forradas com papel de filtro. As sementes dos controles positivos (TFL e MMS) e negativo (água purificada) receberam quatro mL do respectivo componente. Em seguida, as placas foram fechadas, revestidas com filme plástico à base de PVC e foram incubadas em estufa

(Fanem - Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 120 horas na ausência de luz, à temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram preparadas quatro placas perfazendo no mínimo 100 sementes para cada concentração em cada grupo. Após incubação, foi calculado o índice de germinação (IG) para cada concentração de cada grupo em função do percentual de sementes germinadas em relação ao total de sementes expostas.

6.2.7 Crescimento de radículas

O método de avaliação do crescimento radicular (CR) de Onwuamah *et al.* (2014) foi adaptado e utilizado neste estudo. Após 120 horas as radículas emergentes das sementes foram avaliadas quanto aos aspectos fenotípicos, como: (i) cor, (ii) textura e (iii) presença de alterações de crescimento (dobras, massa entumecida e radículas bífidas). Em seguida, com o auxílio de um paquímetro (com escala de leitura de $0,05\text{ mm} - 1/128''$) (Disma), foi mensurado o comprimento da radícula em milímetros (mm) para cada semente que se desenvolveu em cada grupo exposto as diferentes concentrações de IFA e do medicamento à base de NVP, incluindo os controles, exceto MMS^d.

6.2.8 Preparação de lâminas: coloração e fixação

Adaptou-se a metodologia descrita por Caritá, Mazzeo e Marin-Morales (2019), e após incubação por 120 horas, dez radículas de cada placa foram coletadas, seccionadas e fixadas com Carnoy (3:1), uma hora antes do início do preparo da lâmina. Previamente ao preparo, as radículas foram lavadas com água purificada e secas. A reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978) foi realizada em béquer contendo cinco mL de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L e aquecido em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 11 minutos. Em seguida, as radículas foram rapidamente lavadas para cessar a hidrólise, secas e colocadas dentro de frasco de vidro âmbar contendo o

^d Considerando-se a atividade carcinogênica do MMS e por questões de segurança biológica, as radículas não foram manipuladas para medição no laboratório, sendo diretamente pinçadas para o fixador de Carnoy para o preparo de lâminas permanentes.

reagente Schiff. Após duas horas de incubação no escuro, o excesso de reagente foi removido com toalha de papel.

A região meristemática das radículas e a região F1 de cada grupo foram separadas, cortadas com auxílio de um bisturi e, em seguida, cada região foi recoberta com uma lamínula e foi gotejado carmim acético a 1% sobre a amostra. O excesso da solução foi retirado e a lâmina foi exposta à chama rapidamente por dois segundos. Ao final, as lâminas preparadas foram imersas em nitrogênio líquido para fixação e para conservação das amostras para avaliação posterior em microscópio óptico (Eclipse E200) na objetiva de 40 vezes.

6.2.9 Avaliação do Índice Mitótico

Foram analisadas pelo menos 500 células da região meristemática de cada lâmina, perfazendo um total de 5.000 células analisadas de cada concentração de cada grupo. Seguindo os critérios de Caritá e Marin-Morales (2008), foi identificada a etapa da mitose em que se encontrava o núcleo de cada célula (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase). O índice mitótico (IM) foi calculado por meio do percentual de células em divisão em relação ao número total de células analisadas.

6.2.10 Avaliação das aberrações cromossômicas e alterações nucleares na região meristemática

O teste foi adaptado do protocolo de Grant (1982; 1994) e Caritá, Mazzeo e Marin-Morales (2019). Na região meristemática foram analisadas pelo menos 5.000 células de cada concentração em cada grupo quanto à presença de binúcleos, células poliploides, C-metáfase, micronúcleos, microcélulas, brotos celulares, quebra, perda, aderência cromossômica, anáfases multipolares, pontes e atrasos na anáfase e/ou na telófase, seguindo os critérios de Caritá e Marin-Morales (2008). O índice de aberrações cromossômicas (IAC) foi obtido pelo percentual de células com alterações cromossômicas em relação ao total de células analisadas para cada concentração de cada grupo. O índice de alterações nucleares (IAN) foi obtido pelo

percentual de células com alterações no núcleo (minicélulas, micronúcleos e brotos) em relação ao total de células analisadas para cada concentração de cada grupo.

6.2.11 Avaliação do Índice de Mutagenicidade

Na região F1 foram analisadas pelo menos 3.000 células para cada concentração de cada grupo quanto à presença micronúcleos e brotos. Resumidamente, o índice de mutagenicidade (IMT) foi obtido pelo percentual de células com micronúcleos e brotos em relação ao total de células analisadas de cada concentração de cada grupo (MA *et al.*, 1995; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

6.2.12 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o software gratuito R, versão 4.0.3. Inicialmente, foi realizado um teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, a partir dos resultados obtidos em cada grupo foi realizada a comparação dois a dois de Mann Whitney para dados não paramétricos que foi eleito por ser mais sensível. Valores de $p < 0.05$ (isto é, 95% de confiança) foram considerados como diferença estatisticamente significativa.

6.3 Resultado e discussão

Neste estudo, o IFA e o medicamento à base de NVP apresentaram concentrações analíticas similares nas replicatas avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1 (Estudo II) - Concentrações analíticas do ingrediente ativo farmacêutico (IFA) nevirapina (NVP) e do medicamento à base de NVP utilizados nos experimentos com *A. cepa*

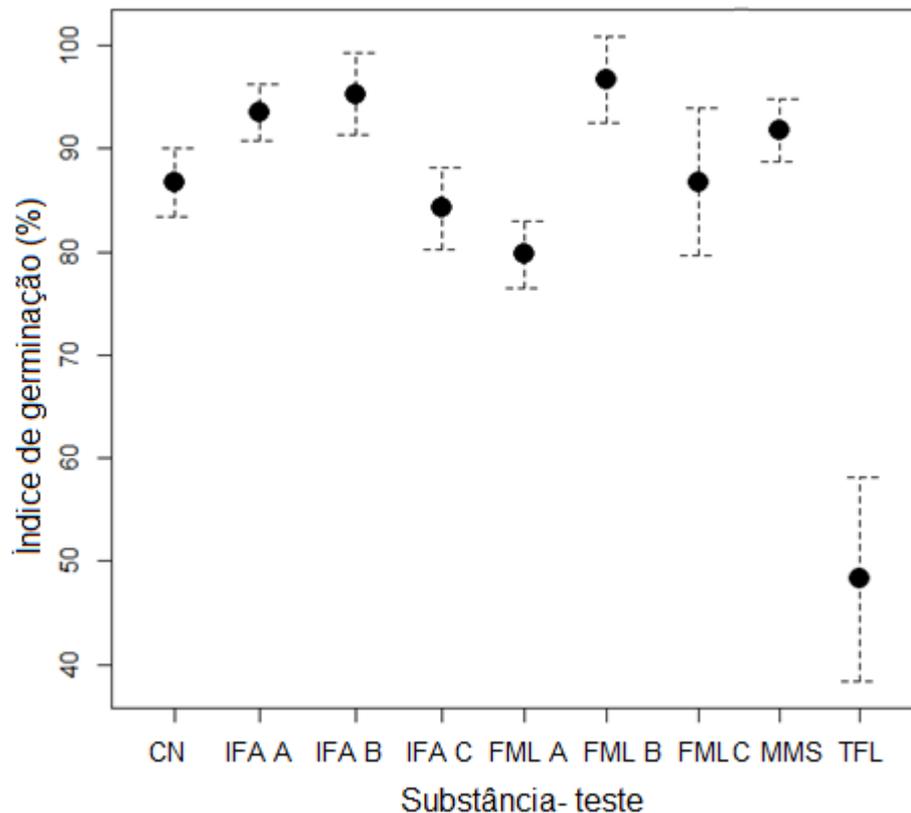
Solução/ Suspensão	Concentração de NVP (mg/L)	
	IFA	Medicamento
A	6,42 ± 0,58	5,48 ± 0,44
B	9,54 ± 0,87	11,20 ± 1,13
C	17,73 ± 1,31	17,68 ± 1,29

Fonte: Dados da autora

A similaridade das concentrações entre IFA e medicamento facilitou a comparação entre eles quanto à possível interferência dos excipientes nos resultados observados.

O índice de germinação do lote de sementes utilizado nos testes atendeu às expectativas com base no IG controle negativo ($86,8 \pm 2,1$). A citotoxicidade de NVP sobre *A. cepa* foi avaliada pelo IG das sementes (Figura 1).

Figura 1 (Estudo II) - Comparação do Índice de Germinação entre grupos de sementes de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)



Legenda:

CN – Controle negativo; IFA – ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$); B ($9,54 \pm 0,87$) e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; FML – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas A ($5,48 \pm 0,44$); B ($11,20 \pm 1,13$) e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L; TFL – trifluralina (0,019 ppm) (controle positivo); MMS – metilmetanossulfonato (4×10^{-4} mol/L) (controle positivo).

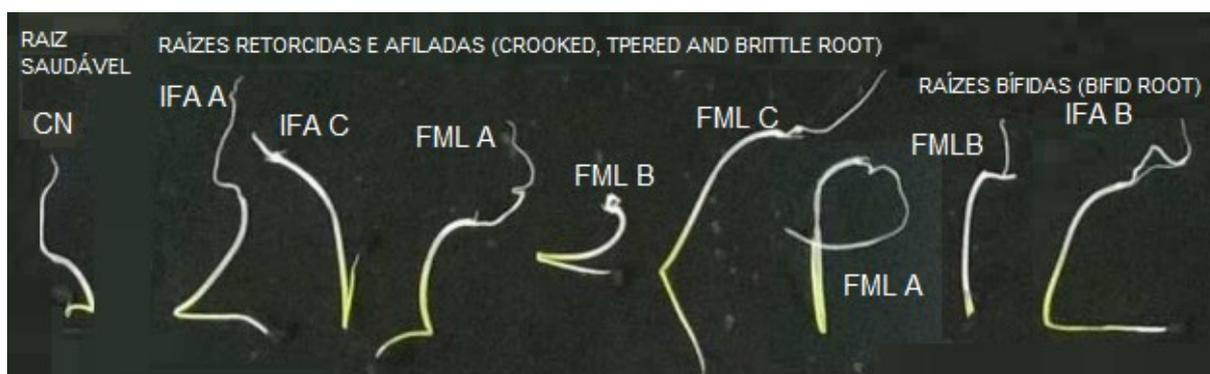
Fonte: Dados da autora

A germinação das sementes de *A. cepa* expostas à TFL de $48,2 \pm 6,2$, foi estatisticamente menor que o controle negativo ($p = 0,0294$). Normalmente, os herbicidas inibem a atividade proteica das células, promovendo a inibição do desenvolvimento, injúria ou morte do organismo (LANCASTER; JUGULAM; JONES, 2021). A TFL pertence ao grupo das dinitroanilina e age seletivamente como disruptor da mitose, inibindo a divisão celular nos tecidos meristemáticos, apresentando efeitos aneugênicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). Quanto às sementes expostas ao MMS, observou-se índice de germinação de $91,8 \pm 1,9$, portanto estatisticamente maior que o controle negativo ($p = 0,0396$). O MMS atua sobre as bases nitrogenadas guanina e adenina do DNA, por adição ou substituição de grupos alquila, o que provoca o emparelhamento incorreto de bases, bloqueio da replicação celular e alterações permanentes no material genético (VONARX *et al.*, 1998). Esse resultado macroscópico está de acordo com o esperado para o MMS como controle positivo, pois nas concentrações utilizadas, ele não impediu a germinação das sementes e permitiu o alongamento das radículas para a observação das alterações genéticas em *A. cepa* e seu uso na comparação de genotoxicidade e mutagenicidade.

Nas concentrações $6,42 \pm 0,58$ e $9,54 \pm 0,87$ mg/L do IFA e $11,20 \pm 1,13$ mg/L do medicamento à base de NVP apresentaram IGs estatisticamente maiores que o CN (IGs $95,2 \pm 2,5$; $p = 0,0284$; $95,2 \pm 2,5$; $p = 0,0294$ e $96,8 \pm 2,6$; $p = 0,0284$, respectivamente) e similares ao MMS ($p > 0,05$), indicando a estimulação do organismo, denominada efeito hormese, no qual o organismo aumenta seu metabolismo em resposta à toxicidade para vencer a adversidade. Observou-se que na concentração $5,48 \pm 0,44$ mg/L do medicamento à base de NVP, houve cerca de 10% de inibição da germinação (IG $79,8 \pm 2,1$; $p = 0,0284$) quando comparado ao CN. As concentrações $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $17,68 \pm 1,2$ mg/L do medicamento apresentaram IGs similares ao CN (IGs $84,2 \pm 2,5$ e $86,8 \pm 4,5$; $p > 0,05$), o que permite afirmar que nessas concentrações a NVP não inibiu a germinação, mas não se pode afirmar sobre a viabilidade do organismo e sobre as suas gerações.

Quanto ao crescimento, as radículas do controle negativo apresentaram massa e cor homogêneas e sem anormalidades morfológicas, com crescimento médio de 1,7 (0,6) mm em 120 horas de teste, enquanto foram observadas raízes bífidas, retorcidas, quebradiças e presença de tumores (abaulamento nas raízes) quando expostas às concentrações do IFA e do medicamento à base de NVP (Figura 2).

Figura 2 (Estudo II) - Morfologia de radículas *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)



Legenda:

CN – Controle negativo; **IFA** – ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$); B ($9,54 \pm 0,87$) e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; **FML** – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas B ($11,20 \pm 1,13$) e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L.

Fonte: Dados da autora

Na Tabela 2 está demonstrado o crescimento radicular dos grupos. Nas concentrações $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $5,48 \pm 0,44$; $11,20 \pm 1,13$ e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento, os CRs foram estatisticamente inferiores ao controle negativo atingindo a redução de 25% na concentração $5,48 \pm 0,44$ mg/L do medicamento (CRs $1,5 \pm 0,6$ mm; p 0,0108; $1,4 \pm 0,6$ mm; p 0,0180; $1,3 \pm 0,6$ mm; p 0,0002; $1,4 \pm 0,5$ mm; p 0,0017 e $1,4 \pm 0,6$ mm; p 0,0000, respectivamente). Apenas na concentração $6,42 \pm 0,58$ mg/L do IFA, o CR de $1,7 \pm 0,5$ foi similar ao controle negativo (p > 0,05). Esses resultados são corroborados por Onwuamah *et al.* (2014). Estes autores utilizaram a forma farmacêutica xarope de NVP, porém não foram apresentados resultados do IFA que permitissem comparar as possíveis interferências do xarope e excipientes na determinação da concentração efetiva de

inibição de 50% (CE50%) do crescimento radicular de *A. cepa*. Ressalta-se que as concentrações do IFA isolado e do medicamento deste estudo estavam dentro da faixa testada por Onwuamah *et al.* (2014), porém foram inferiores à CE50% de 24,63 mg/L de NVP determinada por eles.

Tabela 2 (Estudo II) - Crescimento radicular (mm) entre grupos de sementes de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)

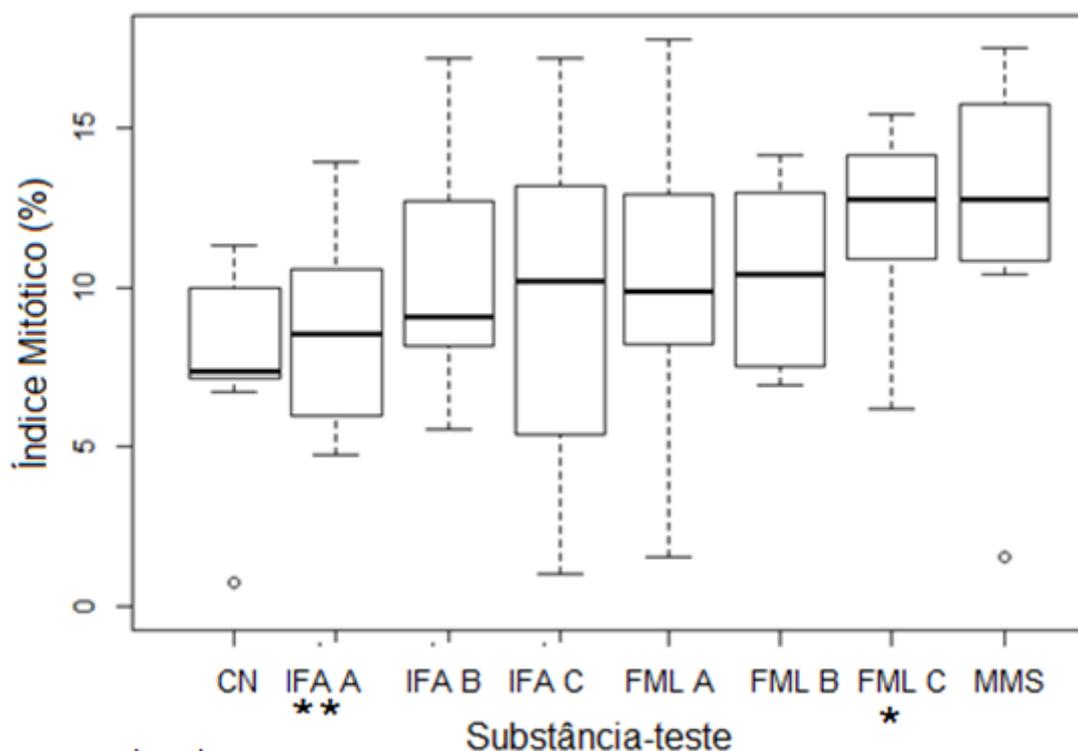
Grupo (n = 100)	Crescimento Radicular (mm)		Valor de p (comparação com CN)
	Média	Desvio Padrão	
CN	1,7	0,6	-
TFL	0,7	0,2	0,0000
IFA A	1,7	0,5	>0,5
IFA B	1,5	0,6	0,010820
IFA C	1,4	0,6	0,018020
FML A	1,3	0,6	0,000179
FML B	1,4	0,5	0,001720
FML C	1,4	0,6	0,000003

Nota: CN – controle negativo; IFA - ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$) mg/L, B ($9,54 \pm 0,87$) mg/L e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; FML – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas A ($5,48 \pm 0,44$) mg/L, B ($11,20 \pm 1,13$) mg/L e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L; TFL - trifluralina (0,019 ppm) (controle positivo).

Fonte: Dados da autora

Contudo, esses resultados macroscópicos não permitiram inferir por completo sobre o potencial citotóxico das substâncias testadas, pois, mesmo sem uma alteração significativa na germinação e no crescimento radicular, danos ao material genético podem ter ocorrido, sendo necessária a avaliação da integridade do processo proliferativo por meio dos cortes histológicos nas células meristemáticas (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012). Assim, o índice mitótico (Figura 3) foi utilizado para confirmar as evidências de citotoxicidade (MERCADO; CALEÑO, 2019).

Figura 3 (Estudo II) - Índices mitóticos da região meristemática das radículas de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)



Legenda:

CN – Controle negativo; IFA – ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$); B ($9,54 \pm 0,87$) e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; FML – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas A ($5,48 \pm 0,44$); B ($11,20 \pm 1,13$) e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L; MMS – metilmetanossulfonato (4×10^{-4} mol/L) (controle positivo).

*Valor de $p < 0,05$ em relação ao CN.

**Valor de $p < 0,05$ em relação ao MMS

Fonte: Dados da autora

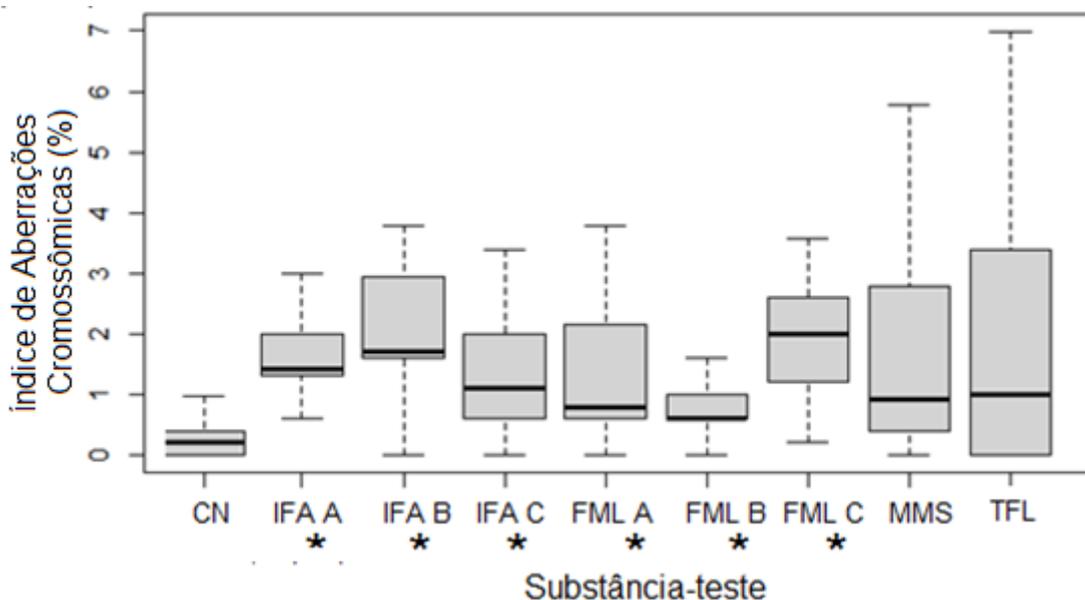
O índice mitótico (IM) do CN e do MMS foram $7,4 \pm 2,7$ e $12,8 \pm 4,5$, respectivamente. Na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, o IM de $12,7 \pm 2,7$ foi estatisticamente maior que o CN ($p 0,0029$) e similar ao MMS ($p > 0,05$), o que indicou que nessa concentração a NVP, foi citotóxica. O IM de $8,5 \pm 4,0$ observado na concentração $6,42 \pm 0,58$ mg/L do IFA foi o único similar ao controle negativo ($p > 0,05$) e que diferiu do MMS ($p 0,0185$), o que sugeriu que nessa concentração a NVP não provocou perturbações no processo proliferativo de

A. *cepa*. Por outro lado, na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento o IM de $12,7 \pm 2,7$, foi estatisticamente maior que o controle negativo (p 0,0029) e similar ao MMS ($p > 0,05$), indicando que nessa concentração a NVP pode ser considerada citotóxica. Este resultado foi similar ao encontrados por Onwuamah *et al.* (2014) que observaram a redução significativa do índice mitótico após a exposição de raízes de bulbos de cebola a um xarope de NVP na concentração de 12,32 mg/L de NVP, no entanto, sem a comparação com o agente alquilante.

Fiskejo (1994) e Krüger (2009) consideram que o crescimento radicular e o índice mitótico podem ser *endpoints* a serem observados para a avaliação de citotoxicidade. Observou-se que nesse estudo os achados macroscópicos do crescimento radicular corresponderam ao índice mitótico nas concentrações $6,42 \pm 0,58$ mg/L do IFA (não citotóxica) e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento (citotóxica).

A genotoxicidade foi avaliada por meio do índice de aberrações cromossômicas (Figura 4). Foi verificado que os índices de anormalidades cromossômicas (IACs) do controle negativo, MMS e TFL foram $0,2 \pm 0,4$; $0,9 \pm 2,1$ e $1,0 \pm 3,3$, respectivamente. Nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$; $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $5,48 \pm 0,44$; $11,20 \pm 1,13$ e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, os IACs foram estatisticamente maiores que o CN e similares ao MMS e à TFL ($p > 0,05$), sugerindo que a NVP apresentou potencial genotóxico em todas as concentrações testadas (IACs $1,4 \pm 0,6$; p 0,0003; $1,7 \pm 1,3$; p 0,0016; $1,1 \pm 1,3$; p 0,0086; $0,8 \pm 1,5$; p 0,0202; $0,6 \pm 0,4$; p 0,0419; $2,0 \pm 1,3$; p 0,0011, respectivamente). É importante observar que na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, além de ser observada a maior inibição do crescimento radicular e o maior índice mitótico, também houve o maior IAC. Nesta concentração foram observadas anormalidades como perda, quebra e aderência de cromossomos.

Figura 4 (Estudo II) - Índices de aberrações cromossômicas na região meristemática das radículas de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)



Legenda:

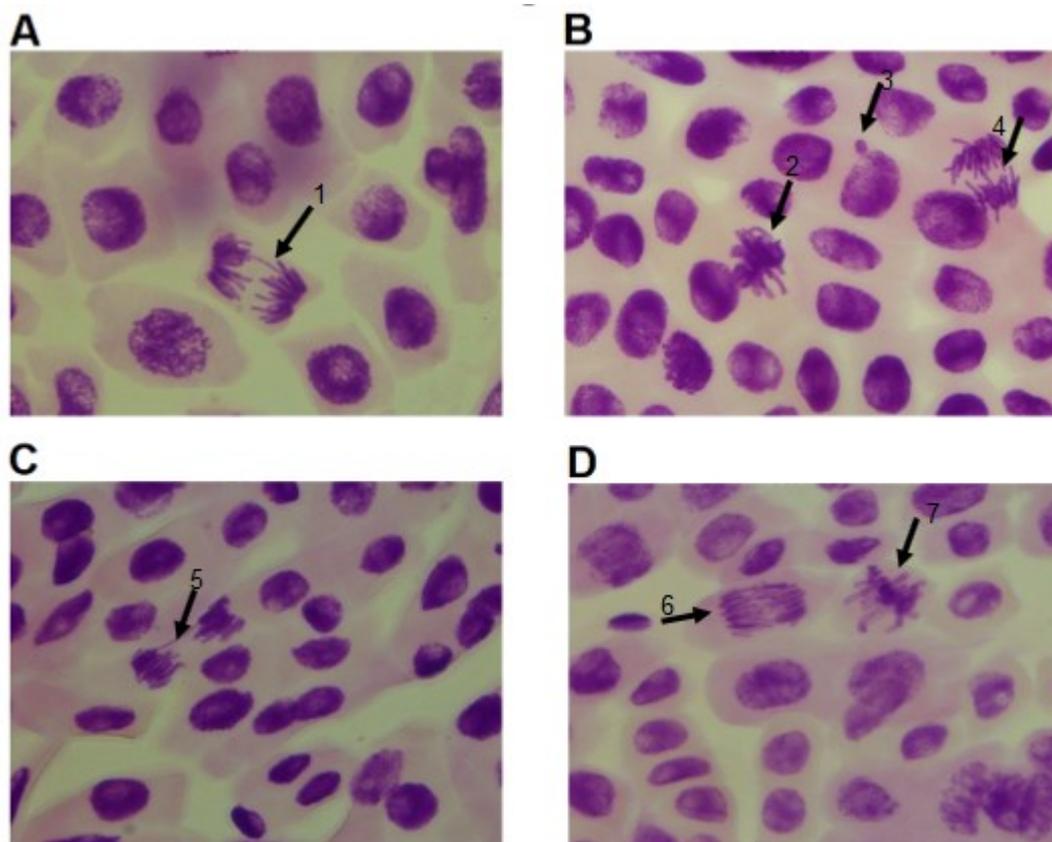
CN – Controle negativo; **IFA** – ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$); B ($9,54 \pm 0,87$) e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; **FML** – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas A ($5,48 \pm 0,44$); B ($11,20 \pm 1,13$) e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L; **MMS** – metilmetanossulfonato (4×10^{-4} mol/L) (controle positivo); **TFL** – trifluralina (0,019 ppm) (controle positivo)

*Valor de $p < 0,05$ em relação ao CN.

Fonte: Dados da autora

Nas Figuras 5 e 6 estão apresentados alguns exemplos de aberrações cromossômicas identificadas nos grupos expostos à NVP.

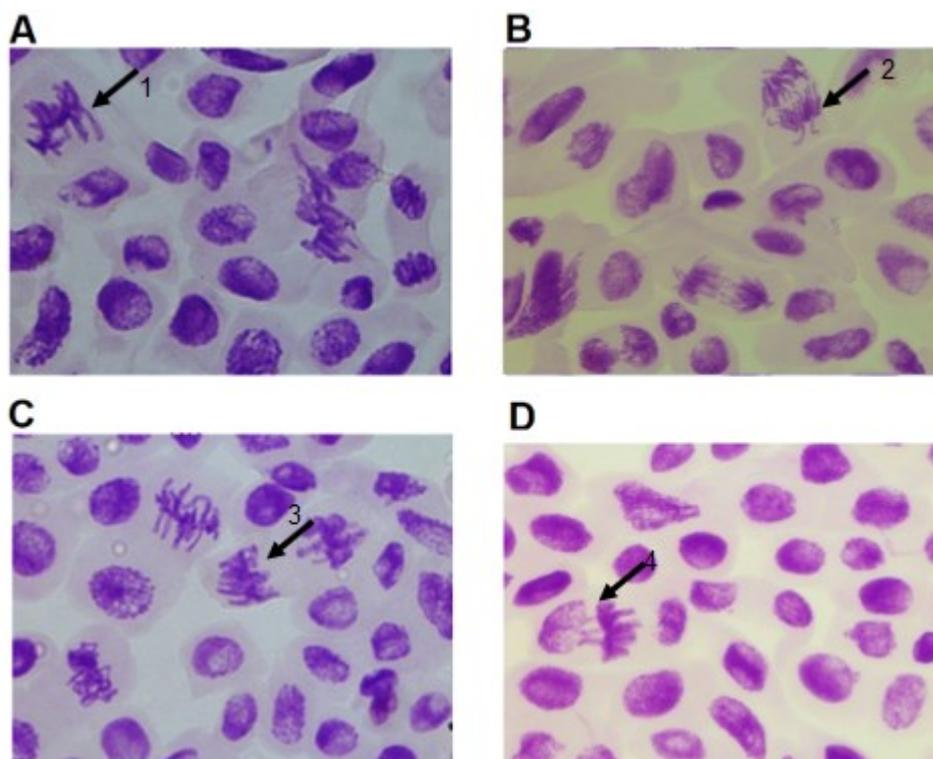
Figura 5 (Estudo II) - Aberrações cromossômicas na região meristemática das radículas de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) nevirapina (NVP)



Legenda: A - $6,42 \pm 0,58$ mg/L; 1 - anáfase com ponte; B $6,42 \pm 0,58$ mg/L; 2 - metáfase normal; 3 - broto e 4 - metáfase aderente; C $9,54 \pm 0,87$ mg/L; 5 - anáfase com ponte; D $17,73 \pm 1,31$ mg/L; 6 - anáfase e 7 - metáfase com aderência.

Fonte: Dados da autora.

Figura 6 (Figura II) - Aberrações cromossômicas na região meristemática das radículas de *A. cepa* expostas ao medicamento à base de nevirapina (NVP)



Legenda: A $5,48 \pm 0,44$ mg/L; 1-metáfase aderente; B $17,68 \pm 1,29$ mg/L; 2 - anáfase aderente; C $11,20 \pm 1,13$ mg/L; 3 - metáfase anormal; D $17,68 \pm 1,29$ mg/L; 4- anáfase aderente.

Fonte: Dados da autora.

Foi verificado no controle negativo um percentual de $1,2 \pm 1,7$ de aderências cromossômicas (AdC). Nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $5,48 \pm 0,44$; $11,20 \pm 1,13$ e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, os percentuais de aderências cromossômicas foram maiores que o controle negativo (AdC $7,9 \pm 3,3$; p 0,0003; $10,3 \pm 5,5$; p 0,0013; $6,6 \pm 5,3$; p 0,0072; $6,6 \pm 6,0$; p 0,0112; $3,7 \pm 2,6$; p 0,0319; $9,3 \pm 5,2$; p 0,0008, respectivamente). Essa anormalidade foi a mais frequentemente observada neste estudo. Esse resultado é corroborado por Onwuamah *et al.* (2014) que também observaram a predominância de aderências cromossômicas em relação aos demais tipos de anormalidades quando *A. cepa* foi exposta à NVP.

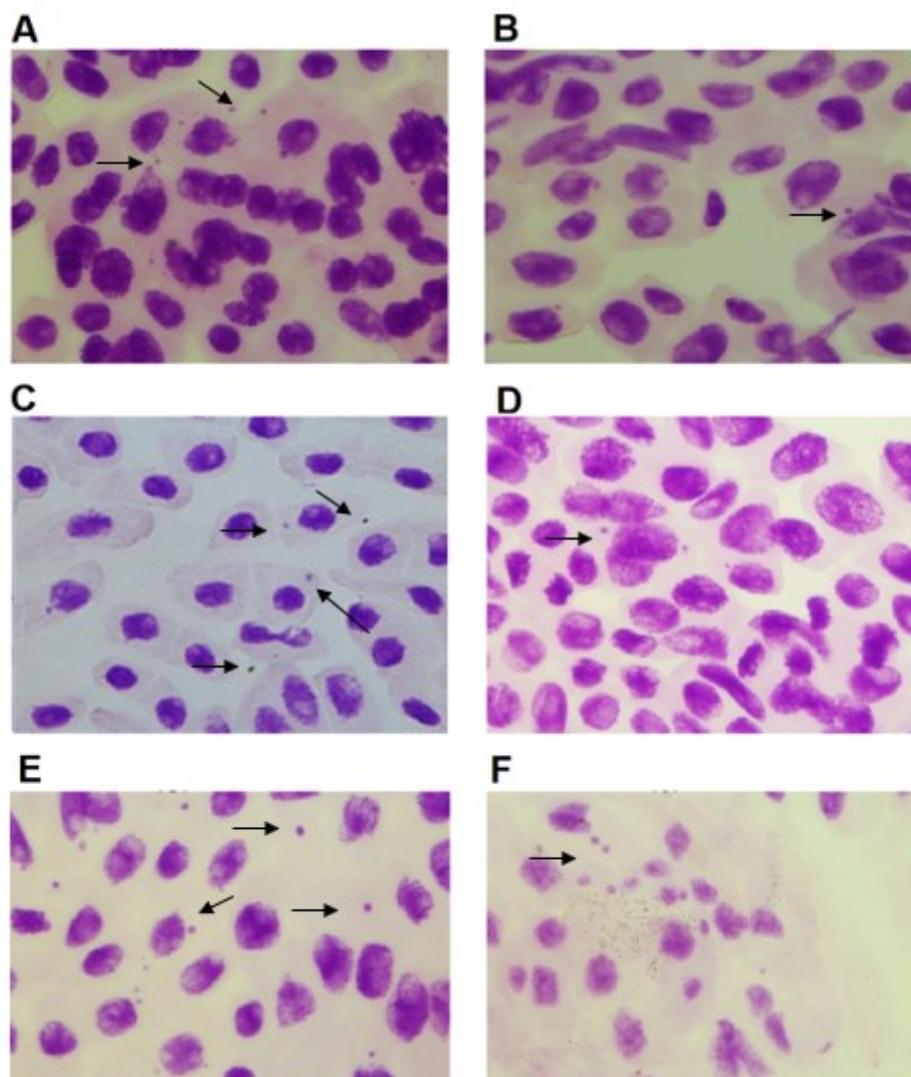
Segundo Kurás (2004), as aderências resultam de alteração na proporção entre histonas e outras proteínas responsáveis pela organização da cromatina nuclear que

aumentam a adesividade, induzindo a formação de metáfases e anáfases atípicas, pontes cromossômicas e inibindo a citocinese, formando células binucleadas, tornando-as indicativas de efeitos aneugênicos da substância teste (LEME; MARIN-MORALES, 2008; 2009).

De fato, os percentuais de aderências dos grupos expostos à NVP nas concentrações testadas foram similares ($p > 0,05$) à TFL ($AdC_{10,5} \pm 13,0$), substância que atua nas fases da divisão celular, inibindo seletivamente a tubulina (enzima responsável pela formação de microtúbulos), inibindo a germinação das sementes e a formação de novas células na radícula e caulículo (LANCASTER; JUGULAM; JONES, 2021). Desse modo, a predominância de aderências cromossômicas observadas nos grupos expostos à NVP sugere que ela tenha um efeito aneugênico assim como a TFL (FERNANDES; PIZANO; MARIN-MORALES, 2013). Com base no seu mecanismo de ação, é possível que NVP, assim como a TFL, atue como inibidor enzimático em vias metabólicas responsáveis pela síntese de proteínas responsáveis pelas atividades do fuso mitótico.

A análise histológica ilustra a presença de micronúcleos na região meristemática (Figura 7), como possível efeito aneugênico relacionado à indução de espécies radicalares relacionadas à estrutura dipiridil da NVP, que pode ter contribuído para danos ao material genético nuclear que tendem a ser expulsos do interior da célula na forma de brotos ou micronúcleos.

Figura 7 (Estudo II) - Micronúcleos originados na região meristemática de radículas de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações de NVP



Legenda:

IFA – ingrediente ativo farmacêutico; FML – medicamento à base de NVP; A – IFA $6,42 \pm 0,58$ mg/L; B - IFA $17,73 \pm 1,31$ mg/L; C - FML $5,48 \pm 0,44$ mg/L; D - FML $17,68 \pm 1,29$ mg/L; E – MMS – metilmetanossulfonato 4×10^{-4} mol/L; F – TFL - trifluralina 0,019 ppm

Fonte: Dados da autora.

Uma contribuição importante desse estudo foi o índice de mutagenicidade para a NVP (Tabela 3), o qual foi investigado na região meristemática e na região F1.

Tabela 3 (Estudo II) - Anormalidades nucleares na região meristemática e na Região F1 e Índice de Mutagenicidade entre grupos de sementes de *A. cepa* expostas ao ingrediente ativo farmacêutico (IFA) e a um medicamento à base de nevirapina (NVP)

Grupo	Anormalidades nucleares (%)					
	Região Meristemática (n = 5000)			Região F1 (n = 3000)		
	Índice de Anormalidades Nucleares			Índice de Mutagenicidade		
	Média	Desvio Padrão	Valor de p (em relação ao CN)	Média	Desvio Padrão	Valor de p (em relação ao CN)
CN	0,4	0,3	-	0,2	0,3	-
TFL	4,3	4,6	0,0010	8,2	11,6	0,0013
MMS	6,9	5,3	0,0001	5,5	6,8	0,0002
IFA A	1,4	0,9	0,0003	1,8	1,4	0,0013
IFA B	1,0	0,4	0,0015	1,3	0,9	0,0017
IFA C	1,3	0,9	0,0094	1,0	0,8	0,0003
FML A	1,0	0,7	0,0199	0,3	0,3	>0,05
FML B	0,8	1,0	0,0417	0,5	0,6	>0,05
FML C	1,3	0,7	0,0011	0,5	0,3	0,0237

Nota:

CN – controle negativo; IFA - ingrediente ativo farmacêutico nevirapina (NVP) nas concentrações analíticas A ($6,42 \pm 0,58$), B ($9,54 \pm 0,87$) e C ($17,73 \pm 1,31$) mg/L; FML – medicamento à base de NVP nas concentrações analíticas A ($5,48 \pm 0,44$), B ($11,20 \pm 1,13$) e C ($17,68 \pm 1,29$) mg/L; MMS – metilmetanossulfonato (4×10^{-4} mol/L e TFL – trifluralina 0,019 ppm)

Fonte: Dados da autora

Observou-se o índice de mutagenicidade (IMT) do CN foi de $0,2 \pm 0,3$. Nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, os IMTs foram estatisticamente maiores que controle negativo (IMTs $1,8 \pm 1,4$; p 0,0013; $1,3 \pm 0,9$; p 0,0017; $1,0 \pm 0,8$; p 0,0003; $0,5 \pm 0,3$; p 0,0237, respectivamente), indicando que nessas concentrações a NVP foi mutagênica para *A. cepa*. Nas concentrações $5,48 \pm 0,44$ e $11,20 \pm 1,13$ mg/L do medicamento não houve diferença em relação ao índice de mutagenicidade do controle negativo, portanto NVP nestes casos não foi mutagênica.

Foram observados brotos e micronúcleos na região F1, no entanto a anormalidade mais frequentemente observada foi a presença dos micronúcleos em todas as concentrações de NVP. Em nenhuma das lâminas foi identificada minicélula.

Os micronúcleos localizam-se em geral periféricamente nas células e se originam de quebras e perdas cromossômicas e poliploidias não reparados pela célula (GROVER; KAUR, 1999). Ao expulsar o excesso de material genético, formam-se os brotos e micronúcleos, os quais podem ter origem na região meristemática. Os efeitos genotóxicos, quando não reparados pela célula, propagam-se e podem ser observados na primeira geração de células filhas na região F1 das radículas modificando o índice de alterações nucleares (GROVER; KAUR, 1999; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). De fato, na Tabela 3, puderam ser observados que o índice de anormalidades nucleares (brotos, micronúcleos) na região meristemática do controle negativo foi $0,4 \pm 0,3$ e que nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e $5,48 \pm 0,44$; $11,20 \pm 1,13$ e $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP, os IANs foram estatisticamente maiores que o controle negativo (IANs $1,4 \pm 0,9$; p 0,0003; $1,0 \pm 0,4$; p 0,0015; $1,3 \pm 0,9$; p 0,0094; $1,0 \pm 0,7$; p 0,0199; $0,8 \pm 1,0$; p 0,0417 e $1,3 \pm 0,7$; p 0,0011, respectivamente) replicando-se para todos os índices de mutagenicidade calculados para a região F1, exceto para as concentrações $5,48 \pm 0,44$ e $11,20 \pm 1,13$ mg/L do medicamento à base de NVP.

Embora no teste de Ames com *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, no teste de mutação com células de mamíferos (*Chinese hamster ovary* - CHO / HGPRT cells), e nos ensaios de micronúcleos de medula óssea de camundongo, a NVP não tenha sido considerada mutagênica nem clastogênica pela *International Agency of Research on Cancer* (IRTC) (BOEHRINGER INGELHEIM, 2015), neste estudo foi demonstrado que a espécie vegetal *A. cepa* foi sensível à exposição a este fármaco. Os resultados permitiram evidenciar efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos que podem se reproduzir em outras espécies, em especial quando se considera a bioconcentração de NVP demonstrada para a espécie vegetal alface (*Lactuca sativa*) (AKENGA *et al.*, 2021). Nesse sentido, há que se preocupar com a

possibilidade de contaminação de plantas medicinais e outros vegetais por resíduos ambientais de NVP, os quais merecem atenção quando ao seu controle de lançamento e mitigação nas estações de tratamento de água e efluentes, podendo afetar diretamente e indiretamente a saúde humana.

A solubilidade de NVP foi uma das grandes dificuldades para o estudo, no entanto, a validade dos resultados obtidos está no desenho do estudo certificando a concentração real da NVP à que foram expostas as sementes para germinação e crescimento da radícula, além da aplicação de protocolos internacionalmente aceitos que permitiram confirmar os resultados obtidos.

Embora tenha sido avaliado apenas um medicamento à base de NVP, este estudo permitiu verificar que a concentração $9,54 \pm 0,87$ mg/L do IFA promoveu resposta similar à concentração $11,20 \pm 1,13$ mg/L do medicamento à base de NVP, indicando que apenas nesta concentração os excipientes não interferiram na toxicidade observada para NVP.

A concentração $6,42 \pm 0,58$ mg/L do IFA, não foi considerada citotóxica com base no índice de germinação, no crescimento radicular e no índice mitótico, porém ela foi genotóxica e mutagênica com base no índice de anormalidades cromossômicas e índice de mutagenicidade.

A genotoxicidade foi observada em todas as concentrações testadas, embora apenas nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento à base de NVP ter sido observado potencial mutagênico. A NVP na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento foi considerada citotóxica, genotóxica e mutagênica.

6.4 Conclusões e considerações finais

Conclui-se que a redução da presença de NVP no ambiente possa mitigar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos demonstrados para *A. cepa*

e que podem ameaçar outras espécies. Apesar dos resultados terem sugerido que a NVP atue por mecanismo de ação aneugênico, estudos são necessários para confirmar seu mecanismo de ação em *A. cepa*.

Além de ter o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de NVP, apresentados neste trabalho, diversos outros micropoluentes presentes no meio ambiente podem contribuir para o dimensionamento do risco ambiental decorrente da produção industrial e do consumo humano de medicamentos. Além disso, por meio deste estudo foi possível confirmar que o teste utilizando *A. cepa* a partir de sementes e sua radícula é prático e rápido, podendo ser implementado na rotina laboratorial sem necessidade de grandes investimentos em área física para o monitoramento periódico de efluentes.

Referências

ADEOLA, A. O.; FORBES P.B.C. Antiretroviral Drugs in African Surface Waters: Prevalence, Analysis, and Potential Remediation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.41, n. 2, p. 247–262, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.5127>>

AKENGA, P.; GACHANJA, A.; FITZSIMONS, M. F.; TAPPIN, A. *et al.* Uptake, accumulation and impact of antiretroviral and antiviral pharmaceutical compounds in lettuce. **Sci Total Environ**, v. 766, p. 144499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144499>

ALKADI, H. **A Review on Free Radicals and Antioxidants. Infectious Disorders - Drug Targets**. v. 20, n. 1, p. 16 – 26, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1871526518666180628124323>>

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. D.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>>

BOEHRINGER INGELHEIM, Vetmedica. Safety data sheet United States nevirapine. Version 1. 2015. Disponível em: <https://www.bivetmedica.com/sites/default/files/MSDS/nevirapine-sds-us.pdf>

VIRAMUNE: Tablets/(nevirapine) oral suspension, U.S. prescribing information. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. Ridgefield, CT 06877 USA. 2019. 1 bula de remédio.

Disponível em: <<https://docs.boehringer-ingelheim.com/Prescribing%20Information/PIs/Viramune/Viramune.pdf>>

BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Res**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00070-6)>

CAMPAROTO, M. L. *et al.* Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000100016>>

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.056>>

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M.A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 21475–21483, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05453-y>>

CARMO, L. R.; LEAL, L. S.; RIBEIRO, L. R. *Allium cepa* e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Development Braz.*, Curitiba, v. 6, n. 10, p.82419-82430, 2020. ISSN 2525-8761 82419

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid soil application: Toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/73855>>.

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.**, João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 33-38. 2012.

De CLERCQ, E. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. **Med Res Rev**, v. 13, n. 3, p. 229-258, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/med.2610130303>>

DEL VALLE, L.G.; HERNÁNDEZ, R. G.; ÁVILA, J. P. Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology & Microbiology*. v. 2013, p. 1-15, 2013. Disponível em: <<http://www.ibimapublishing.com/journals/JVM/jvm.html>>

DINIZ, J.S.; FREITAS, L.A.P.; VAZ, I.C.D.; BRABOSA, F.A.R.; MOL, M.P.G.; MAGALHÃES, S.M.E; SILVEIRA, M.R. Os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e19211225014, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25014>>

DOS REIS, H. S. *et al.* Ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato aquoso da casca DE *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) PELO TESTE DE *Allium cepa*. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 20-23, abr. 2020. ISSN 2179-5746. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/5019>>. Acesso em: 26 out. 2022. doi:<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n1p20-23>.

FERNANDES, T. C. 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**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>>

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>>

FERNANDES, T. C. C.; PIZANO M. A.; MARIN-MORALES M. A. Characterization, Modes of Action and Effects of Trifluralin: A Review. **IntechOpen Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**. p. 489-515, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/55169>>

FISKESJÖ, G. The allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, 8, n. 3, p. 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, 9, n. 3, p. 235-241, 1994

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-x](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-x)>

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0)>

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*. **Mutat Res**, v. 259, n. 2, p. 127-132, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90046-o](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90046-o)>

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutat Res**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00065-2)>

GUEDES, C. M. *et al.* Toxicidade de *Ginkgo biloba* L., sem aditivação e associado a excipientes artificiais, em tecido meristemático. Itajubá, MG: Stellata Editora, 2020. *E-book*. Disponível em: <https://stellata.com.br/wp-content/uploads/2020/05/Toxicidade-de-Ginkgo-biloba-L-sem-aditivac%CC%A7a%CC%83o-e-associado-a-excipientes-artificiais-em-tecido-meristema%CC%81tico.pdf>

GUO, X.; *et al.* Electron-Accepting Micelles Deplete Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and Impair Two Antioxidant Cascades for Ferroptosis-Induced Tumor Eradication. **ACS Nano**, v. 14, n.11, p. 14715–14730, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00764>>

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.002>>

KAIRIGO, P. *et al.* Contamination of Surface Water and River Sediments by Antibiotic and Antiretroviral Drug Cocktails in Low and Middle-Income Countries: Occurrence, Risk and Mitigation Strategies. **Water**, v. 12, (5), 1376, 2020. Disponível em: Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/w12051376>>

KIM, S. *et al.* PubChem 2019 update: improved access to chemical 871 data. **Nucleic acids research**, v. 47, p. 1102-1109, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>>

KNOLL, M. F. *et al.* Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300024>>

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 58 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental). Centro Universitário Feevale. Nova Hamburgo - RS. 2009. Disponível em: <<https://aplicweb.feevale.br/site/files/documentos/pdf/29080.pdf>>

KURÁS, L. Characterization of protein–DNA association in vivo by chromatin immunoprecipitation. In: Dickson RC, Mendenhall MD, editors. Signal transduction

protocols, methods in molecular biology (Vol. 284). Totowa: Humana Press Inc.; p. 147–162, 2004.

K'OREJE, K. O. *et al.* 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.** v. 437 p. 153-164, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.052>>

LANCASTER, S.; JUGULAM, M.; JONES, J.F. Herbicide Mode of Action. C715, Kansas State University, K-STATE Research and Extension, 2021. Disponível em: <<https://bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/C715.pdf>>

LEME, D. M.; DE ANGELIS, D. E. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquat Toxicol**, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.012>>

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water- a case study. **Mutation research**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>>

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation research**, v. 682, p. 71-81, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>>

LIANG, Y.; LIANG, N; YIN, L.; XIAO, F. Cellular and molecular mechanisms of xenobiotics-induced premature senescence **Toxicology Research**, v. 9, p. 669–675, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa073>

MA, T. H.; *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res.** v. 334, p. 185-195, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)>

MARTÍN-ALONSO, S.; *et al.* Novel RNase H Inhibitors Blocking RNA-directed Strand Displacement DNA Synthesis by HIV-1 Reverse Transcriptase, **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 7, 2022, p. 167507 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167507>>

MATSUMOTO, S. T.; *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>>

MELLO, M.L.S; VIDAL, B. D C. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives. **Acta Histochem.** v.119. p - 603–609, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>>

MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Sci Total Environ**, v. 700, p. 134452, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>>

MUKHERJEE, S.; *et al.* Imaging Viral Infection by Fluorescence Microscopy: Focus on HIV-1 Early Stage. **Viruses**, v. 13, p. 213, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v13020213>>

NEVES, K. A. D. S.; OLIVEIRA, J. V. A.; TEIXEIRA, A. Z. A. Uso de bioensaio com *Allium cepa* L. para avaliação de citotoxicidade de croton urucurana baill. **Revista Ibero-americana de humanidades, Ciências e Educação**, v. 6, n. 12, p. 07, 12/31 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.29327/217514.6.12-6>>

NGUMBA, E.; GACHANJA, A.; TUHKANEN, T. Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. **Science of the Total Environ**, v.539: p.206–213, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>>

NGUMBA, E. **Occurrence and control of selected antibiotics and antiretroviral drugs in urban hydrological cycles.** 95. 2018

NYIRENDA, J.; MWANZA, A.; LENGWE, C. Assessing the biodegradability of common pharmaceutical products (PPs) on the Zambian market. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05286>>

ONWUAMAH, C. K. *et al.* Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. **Plos one**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2014

PARVAN, L. G.; *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000544>>

RAJI, J. I.; ONWUAMAH, C. K.; ODEIGAH, P. G. C. Artemisinin-Based Combination Therapy Depressed Mitosis and Induced Chromosome Aberration in Onion Root Cells. **Journal of Toxicology**, v. 13, p. 1-13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/4671326>>

RODRIGUES, G. Z. P.; DALZUCHIO, T.; GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta toxicol. argent**, v. 24, n. 2, p. p. 97-104, 2016.

ROEDE, J. R.; MILLER, G. W. Diquat. **Encyclopedia of Toxicology**, v.2. p. 202-204, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00137-8>>

SOODAN, R.; KATNORIA, J.; NAGPAL, A. *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: An Efficient Test System for Evaluating Genotoxicity of Agricultural Soil. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v3, n. 8, p. 245-250, 2014. ISSN (Online): 2319-7064

THE TENORES STUDY GROUP. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. **Lancet Infect Dis**; v. 16, p. 565–75, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00536-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00536-8)>

VONARX, E. J.; *et al.* DNA repair in higher plants. **Mutat Res**, 400, n. 1-2, p. 187-200, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00043-8)

WALENGA, N.J.; NOMNGONGO P.N. Occurrence of pharmaceuticals in the environmental waters: African and Asian perspectives. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 50-66, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.11.002>>

7 CONCLUSÕES

Uma das hipóteses testadas neste estudo foi a capacidade de NVP de promover toxicidade de NVP para os organismos aquáticos e o vegetal elencados de três níveis tróficos diferentes, quais sejam, a bactéria (decompositora) *A. fischeri*, a microalga *C. vulgaris* e o vegetal *A. cepa* (produtores fotossintetizantes) e o microcrustáceo *A. salina* (consumidor primário). Em relação à toxicidade, concluiu-se que todas as espécies foram sensíveis ao fármaco e apresentaram efeitos indicativos de comprometimento metabólico e de sua viabilidade celular. Entre os organismos aquáticos a espécie mais sensível foi bactéria marinha *A. fischeri* cujas CE50% e CE10% foram mais baixas quando comparadas às obtidas para *A. salina* e *C. vulgaris*. As CE50% convergiram em torno da concentração de 20 mg/L de NVP, para os organismos aquáticos, apesar dos diferentes níveis de organização e complexidade celular. Os valores de CE50% e a CE10% para o IFA e medicamento indicam que a concentração em que são observados os primeiros efeitos e a concentração que promove efeitos inibitórios significativos sobre os processos metabólicos das espécies estudadas são muito próximas. Os testes citogenéticos com *A. cepa* realizados em concentrações abaixo de 20 mg/L de NVP também apontaram o potencial genotóxico de NVP em todas as concentrações testadas. A mutagenicidade foi evidenciada nas concentrações $6,42 \pm 0,58$; $9,54 \pm 0,87$ e $17,73 \pm 1,31$ mg/L do IFA e a concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento. Concluiu-se que a NVP pode promover efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos na concentração $17,68 \pm 1,29$ mg/L do medicamento.

A outra hipótese deste estudo foi a possibilidade de alteração do efeito observado para o IFA na presença dos excipientes da formulação. Nesse caso, pode-se concluir que o comportamento das espécies *A. salina* e *A. fischeri* frente à NVP foi modificado na presença de excipientes do medicamento à base de NVP, nas condições laboratoriais. No entanto, essa modificação não alterou o nível de risco de NVP que permaneceu na categoria III, segundo a GHS (2021). Para a espécie *C. vulgaris* concluiu-se que a presença de excipientes não alterou a concentração efetiva em que os efeitos foram observados. O estudo com *A. cepa* concluiu como

pouco provável que os efeitos do IFA para a espécie sejam modificados na presença de excipientes.

Torna-se importante salientar que apesar de a NVP não oferecer risco de toxicidade aguda para microalgas e microcrustáceos, ela pode comprometer a viabilidade das espécies aquáticas estudadas e nesse sentido, não se pode negligenciar o risco de ela afetar ecossistemas locais.

As CE50% indicaram que NVP não apresenta toxicidade aguda para *C. vulgaris* e *A. salina*. Por outro lado, os efeitos citogenéticos observados para *A. cepa* apontaram o risco de ocorrência de efeitos crônicos e/ou subletais, não dose-dependentes que podem ser agravados com a exposição contínua à NVP, persistente na água e no solo por suas características químicas. Portanto, os resíduos de NVP são de interesse ambiental e, nesse sentido, pode-se concluir que a redução da presença desse micropolvente é um fator importante para mitigar os possíveis danos às outras espécies.

O estudo permite concluir também que os testes de toxicidade ambiental podem ser implementados na rotina laboratorial sem necessidade de grandes investimentos em área física para o monitoramento periódico de efluentes.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lipofilicidade dos fármacos como a nevirapina é uma barreira para os ensaios de toxicidade utilizando organismos aquáticos. Além da dificuldade de solubilização, existem outros fatores que alteram a fração solúvel disponível no meio e que podem alterar os resultados. O uso de solventes como adjuvantes para solubilização pode alterar propriedades de membrana e aumentar a permeabilidade do IFA, reduzindo a concentração efetiva, o que implica em conclusões equivocadas quanto à toxicidade da substância testada.

Entre as limitações, assinala-se a dificuldade de simular matrizes complexas como os esgotos industrial e doméstico, em escala laboratorial e prever as múltiplas interações que podem ocorrer entre as substâncias, alterando os efeitos observados sobre as espécies expostas. A presença de fatores abióticos como deposição no sedimento e sorção podem indiretamente afetar a matriz ambiental, indicando que os impactos ambientais podem ser ainda maiores nos locais em que há alto consumo e descargas localizadas de medicamentos. Considerando essas limitações a reprodutibilidade dos ensaios pode não se refletir no ambiente, uma vez que a padronização e controle das condições de teste não serão as mesmas em escala laboratorial. Contudo, o estudo visou categorizar o IFA e o medicamento à base de NVP, quanto ao potencial tóxico e sua possível interferência no ambiente natural. Ressalta-se que os testes foram executados em condições padronizadas seguindo protocolos internacionalmente aceitos para exposição dos organismos nos meios de teste. A certificação da concentração real da NVP a partir de método analítico validado nos meios testados no tempo inicial de teste validou os resultados referentes à categorização de risco da NVP para o ambiente aquático e contribuiu para que a metodologia possa ser aplicada em estudos futuros de toxicidade de matrizes mais complexas contendo NVP.

Embora tenha sido avaliado apenas um medicamento à base de NVP, este estudo permitiu concluir que a interação entre IFAs e excipientes alterou os efeitos observados sobre as espécies testadas, porém o potencial de risco da interação não

foi mensurável, e depende de outros fatores não tratados nessa tese como a frequência de descargas no meio, a fração solúvel na matriz ambiental e a capacidade de induzir desequilíbrios não recuperáveis no ecossistema.

Este estudo do potencial tóxico do IFA e do medicamento contribuiu para o meio ambiente e para a sociedade como ferramenta de avaliação de risco para o estabelecimento do manejo seguro e ações assertivas de contingenciamento nos Planos de Gestão de Risco de produto pela indústria farmacêutica. Nesse sentido, esse estudo demonstrou que é possível utilizar ferramentas padronizadas como os testes ecotoxicológicos para o monitoramento de efluentes na rotina da indústria farmacêutica e contribuir para prevenção de riscos ao ambiente e à saúde humana decorrentes da exposição aos resíduos de fármacos.

Em termos de inovação, o estudo com NVP foi inédito para a microalga *C. vulgaris* e para as espécies marinhas *A. salina* e a bactéria *A. fischeri*. A comparação de efeitos entre o IFA e a formulação também mostrou a necessidade de investigação de influência dos excipientes, ainda pouco discutida. No ensaio com *A. cepa* obteve-se sucesso no uso de sementes em substituição aos bulbos de cebola, o que permitiu a inclusão da germinação também como parâmetro de avaliação de citotoxicidade de NVP. O estudo possibilitou a complementação dos dados de citotoxicidade e de genotoxicidade de NVP disponíveis na literatura, incluindo-se a avaliação inédita da mutagenicidade da região não merismática F1 para o IFA e para o medicamento.

As perspectivas de trabalhos futuros apontam para a necessidade de investigação da influência de fatores abióticos sobre os efeitos observados nos testes para se determinar o potencial de risco da interação entre IFA e excipientes no ambiente.

Os efeitos observados podem estar diretamente ligados a vários fatores orgânicos e atingir mais de uma via metabólica, tornando a elucidação de mecanismos de ação um estudo valioso para relacionar os efeitos entre as diferentes espécies. A

elucidação do mecanismo de ação de NVP poderá ser conduzida com o ensaio de *A. cepa* em trabalhos futuros.

Salienta-se que a bioconcentração de NVP foi demonstrada para a espécie vegetal alface (*Lactuca sativa*) (AKENGA *et al.*, 2021) e que, por essa razão, podem ser conduzidos estudos para avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de NVP em outras espécies.

A exposição contínua à NVP pode acarretar efeitos crônicos e subletais que não foram objeto desse estudo, entre eles a possibilidade de danos ao material genético e o comprometimento da morfologia e funções orgânicas de gerações futuras dos organismos.

De fato, concentrações residuais de fármacos não metabolizados, assim como de seus metabólitos e excipientes farmacêuticos chegam ao ambiente de forma contínua. É esperado que os efeitos sobre as vias bioquímicas humanas, alvo desses agentes, possam se manifestar também sobre organismos não alvos, porém, pouca informação é disponível sobre seus efeitos no ambiente. Deve-se considerar ainda que, além dos efeitos terapêuticos, os fármacos apresentam efeitos tóxicos que podem ser dose-dependentes ou não, tais como, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade que também podem se manifestar em outras espécies, principalmente pela exposição contínua a esses agentes químicos.

Nesse sentido, testes de toxicidade para organismos aquáticos são importantes, pois constituem instrumentos complementares aos testes físico-químicos para estimar a presença e o impacto ambiental de micropoluentes. Os testes padronizados podem ser utilizados como ferramentas para vigilância ambiental, para controle, monitoramento e preservação de corpos d'água e nascentes, para avaliar níveis de impacto dos efluentes industriais sobre o ecossistema aquático, para o gerenciamento de planos de controle e monitoramento ambiental Além dos efeitos específicos sobre o ecossistema aquático, o uso de bioindicadores de poluição ambiental está associado a potenciais riscos à saúde humana devido à exposição contínua direta ou pela cadeia alimentar. Portanto, os estudos de toxicidade

ambiental no âmbito da saúde pública envolvem diferentes aspectos biológicos e socioambientais, ressaltando a relação indissociável entre saúde, patologias humanas e condições ambientais.

Por fim, o conhecimento dos efeitos tóxicos de NVP soma-se ao dos demais micropoluentes, contribuindo para o dimensionamento do risco ambiental decorrente da produção industrial e do consumo humano de medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAFE, O. A.; SPÄTH, J.; FICK, J.; JANSSON, S.; BUCKLEY, C.; STARK, A.; PIETRUSCHKA, B.; MARTINCIGH, B. LC-MS/MS determination of antiretroviral drugs in influents and effluents from wastewater treatment plants in KwaZulu-Natal, South Africa. **Chemosphere**, v. 200, p. 660–670, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.105>

ABBAS, M.; ADIL, M.; EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; MUNIR, B.; YAMEEN, M.; GHAFFAR, A.; SHAR, G. A.; TAHIR, M. A.; IQBAL M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. **Sci. Total Environ.** v. 626, p.1295-1309, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>>

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3:2006**. 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, 2006.

ABU, N. E.; MBA, K. C. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, n. 2, p. 44-51, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/309898350_Mutagenicity_testing_of_pharmaceutical_effluents_on_Allium_cepa_root_tips_meristems>

ADEOGUN, A.O.; IBOR, O.R.; ADEDUNTAN, S.D.; ARUKWE, A. Intersex and alterations in reproductive development of a cichlid, *Tilapia guineensis*, from a municipal domestic water supply lake (Eleyele) in Southwestern Nigeria. **Sci. Total Environ**, v. 541, p. 372–382, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.061>>

ADEOLA, A. O.; FORBES P.B.C. Antiretroviral Drugs in African Surface Waters: Prevalence, Analysis, and Potential Remediation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.41, n. 2, p. 247–262, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.5127>>

AKENGA, P.; GACHANJA, A.; FITZSIMONS, M. F.; TAPPIN, A. *et al.* Uptake, accumulation and impact of antiretroviral and antiviral pharmaceutical compounds in lettuce. **Sci Total Environ**, v. 766, p. 144499, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144499>

ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infectious Disorders - Drug Targets*. v. 20, n. 1, p. 16 – 26, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/1871526518666180628124323>>

ALVIM, L. B. *et al.* Evaluation of the cytogenotoxicity of textile effluents using *Allium cepa* L. **Ambient. Água**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.198>>

AMARANTE, C. B. *et al.* Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, 3, p. 431-434, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>>

AGENCE NATIONALE DE SECURITE SANITAIRE. National analysis campaign on drug residues in water intended for human consumption, 2013. Disponível em: <www.anses.fr/en/content/national-analysis-campaign-drug-residues-water-results-line-expectation> Acesso em: 18 ago. 2021

ANTHONY, R.G.; HUSSEY, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 112–116, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01378-3](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01378-3)>

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L. *et al.* Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, p. 5-9, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/esa/v18n3/1413-4152-esa-18-03-00187.pdf>>.

ARTIKKELI, I. *et al.* Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 206–213, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>>

AWODELE, O. *et al.* Antioxidant modulation of nevirapine induced hepatotoxicity in rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v.8, n.1, p. 8–14, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/intox-2015-0002>>

AYUKO, T. A. *et al.* In vitro antiplasmodial activity and toxicity assessment of plant extracts used in traditional malaria therapy in the Lake Victoria Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n.5, p. 689-94, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000500004>>

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. D.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300019>>

BARRETO, José Carlos Nunes. **Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante bioensaios com microorganismos**. 1995. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

BIEL-MAESO, M. *et al.* Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Sci. Total Environ.** v. 612, p. 649–659, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.279>>

BIGGINS, J. **Respiration in blue-green algae**, Journal of bacteriology, 1969. Doi: <https://doi.org/10.1128/jb.99.2.570-575.1969>

BIO INTELLIGENCE SERVICE. Study on the environmental risks of medicinal products, Final Report prepared for Executive Agency for Health and Consumers. 2013. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/study_environment_0.pdf> Acesso em: 18 nov. 2021

BOEHRINGER INGELHEIM, Vetmedica. Safety data sheet United States nevirapine. Version 1. 2015. Disponível em: <https://www.bivetmedica.com/sites/default/files/MSDS/nevirapine-sds-us.pdf>

BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

BORECKA, M. *et al.* The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards the green algae *Chlorella vulgaris*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, n. 5, p. 179-186 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.041>>

BOXALL, A. B. A. *et al.* Exploiting monitoring data in environmental exposure modelling and risk assessment of pharmaceuticals. **Environment International**, v.73 p.176-185, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.018>>

BRAGUINI, W. L.; ALVES, B. B.; PIRES, N. V. Toxicity assessment of *Lavandula officinalis* extracts in Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 29, n. 6, p. 411-420, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1567892>>:

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes**. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. E-book. Disponível em: <http://antigo.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-criancas-e>

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Res**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00070-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00070-6)>

CAMPAROTO, M. L. *et al.* Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000100016>>

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.056>>

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M.A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 21475–21483, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05453-y>>

CARMO, L. R.; LEAL, L. S.; RIBEIRO, L. R. *Allium cepa* e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Development Braz.*, Curitiba, v. 6, n. 10, p.82419-82430, 2020. ISSN 2525-8761 82419

CASTILLO-ZACARÍAS, C. *et al.* Antidepressant drugs as emerging contaminants: occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. **Sci. Total Environ**, v. 757, n. 25, p. 143722, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143722>>

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181-189, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00033-7)>

CHEN, S. *et al.* Ecotoxicological effects of sulfonamides and fluoroquinolones and their removal by a green alga (*Chlorella vulgaris*) and a cyanobacterium (*Chrysochloris ovalisporum*). **Environmental Pollution**, v. 263, Part A, p. 114554, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114554>>

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid soil application: Toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/73855>>.

CORDEIRO, R. Cianobactérias isoladas de lagos naturais do Parque Estadual do Rio Doce-MG potencialmente produtoras de biocombustível. 134 f. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre). Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

COSTA, C. R. *et al.* Toxicity in aquatic environments: Discussion and evaluation methods. **Química Nova**, v. 31, p.1820-1830, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>>

CRESSEY, T. R.; *et al.* Assessment of Nevirapine Prophylactic and Therapeutic Dosing Regimens for Neonates. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, v. 15, n. 75(5), p. 554-560, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0000000000001447>>

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.**, João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 33-38. 2012.

CZAPLICKA, A.; LODOWSKA, J. Biomonitoring of surface water by synchronous culture of *Chlorella vulgaris* algae. **Environment Protection Engineering**, v. 40, n. 4, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.37190/epe140403>>

CZECH, B.; JOŚKO, I.; OLESZCZUK, P. Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.104, p.247-253, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.024>>.

DARIENKO, T. *et al.* Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella*-like organisms, including a description of *Droopiella* gen. nov. **Systematics and Biodiversity**, v.17, n.8, p.811-829, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14772000.2019.1690597>>

DAS, K.; MARTINEZ, S. E.; BAUMAN, J. D.; ARNOLD, E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism. **Nature Structural & Molecular Biology**, v 19, p. 253-259, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nsmb.2223>>

De CLERCQ, E. HIV-1-specific RT inhibitors: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are specifically targeted at the viral reverse transcriptase. **Med Res Rev**, v. 13, n. 3, p. 229-258, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/med.2610130303>>

De CLERCQ, E. New Perspectives for the Treatment of HIV Infections, **Collect. Czech. Chem. Commun.**, v. 93, n. 449, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1135/cccc19980449>>

De CLERCQ, E. The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection, **Antiviral Res**, v. 38, p. 153, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(98\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(98)00025-4)>

De GARCÍA, S. O.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; IRUSTA-MATA, R. Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. **Ecotoxicology**, v. 25: p.141-162, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-015-1576-8>>

Del VALLE, L. G.; HERNÁNDEZ, R. G.; ÁVILA, J. P. Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology & Microbiology**, v. 2013, 279685, p.15, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5171/2013.279685>>

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv>

DINIZ, J.S.; FREITAS, L.A.P.; VAZ, I.C.D.; BRABOSA, F.A.R.; MOL, M.P.G.; MAGALHÃES, S.M.E; SILVEIRA, M.R. Os efeitos tóxicos do antirretroviral nevirapina e de um medicamento à base de nevirapina para organismos aquáticos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e19211225014, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25014>>

DI NICA, V.; VILLA, S.; FINIZIO, A. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Evidence of toxicological interactions in binary combinations. **Environ Toxicol Chem**, v. 36, n. 3, p. 815-822, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.3686>>

DIAZ-SOSA, V. R. *et al.* Monitoring and Ecotoxicity Assessment of Emerging Contaminants in Wastewater Discharge in the City of Prague (Czech Republic). **Water**, v. 12, p. 1079, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/w12041079>>

DONG, Y. *et al.* The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*. **Emerg. Contam.** v. 5, p.297-302. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.08.004>>.

DOS REIS, H. S. *et al.* Ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato aquoso da casca DE *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) PELO TESTE DE *Allium cepa*. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 20-23, abr. 2020. ISSN 2179-5746. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/5019>>. Acesso em: 26 out. 2022. doi:<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v10n1p20-23>.

DRZYMAŁA, J.; KALKA, J. Ecotoxic interactions between pharmaceuticals in mixtures: Diclofenac and sulfamethoxazole, **Chemosphere**, v. 259, 127407, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127407>>

DU, J. *et al.* Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p.142. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gks549>>

DUNN, A. K. *Vibrio fischeri* metabolism: symbiosis and beyond. **Advances in microbial physiology**, v. 61, p. 37–68, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>>

DUTTA, J.; AHMAD, A.; SINGH J. Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. **Caryologia**, v. 71, n. 2, p. 139-145, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1447631>>

DUTTA, J.; MALA, A.A. Induction of chromosomal aberrations in *Allium cepa* root tips cells exposed to azo dye scarlet RR. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v 6, n 4, p. 1932-1937, 2015.

ESNOUF, R. *et al.* Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, n. 4, p. 303–308, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nsb0495-303>>

FERNANDES, T. C. 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**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>>

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>>

FERNANDES, T. C. C.; PIZANO M. A.; MARIN-MORALES M. A. Characterization, Modes of Action and Effects of Trifluralin: A Review. **IntechOpen Herbicides - Current Research and Case Studies in Use**. p. 489-515, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/55169>>

FERNÁNDEZ, L. P. *et al.* Bioaccumulation and glutathione S-transferase activity on *Rhinella arenarum* tadpoles after 813 short-term exposure to antiretrovirals. **Chemosphere**, v. 246, p. 125830, 2020 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125830>>

FISKEJÖ, G. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in roots tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicological and Waters Quality. International Journal**, v. 9, p. 235-241, 1985.

FISKESJÖ, G. The allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, 8, n. 3, p. 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, 9, n. 3, p. 235-241, 1994.

FURTADO, M. F. de M.; FAUSTINO, S. M. M. Antimicrobial activity of microalgae growth (Chlorophyta: *Chlorella vulgaris*), Beijerinck, 1890. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. e25811729801, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i7.29801>>

GAMBARDELLA, C. *et al.* Effects of selected metal oxide nanoparticles on artemia salina larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 7, p. 4249-4259, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10661-014-3695-8>>

GEIGER, E.; HORNEK-GAUSTERER, R.; SAÇAN, M. T. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v.129: p.189-198, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.032>

GIL, L.; HERNÁNDEZ, R. G.; PÉREZ, J. Oxidative Stress Associated to Disease Progression and Toxicity during Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of Virology & Microbiology**, p. 15, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.5171/2013.279685>>

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R. B. *et al.* Decontamination of emerging pharmaceutical pollutants using carbon-dots as robust materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, Part B, p. 127145, ISSN 0304-3894, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127145>>

GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Taxonomic identification and lipid production of two Chilean *Chlorella*-like strains isolated from a marine and an estuarine coastal environment. **AoB Plants**, v.5, plt020, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/aobpla/plt020>>

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-x](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-x)>

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0)>

GRINTEN, E. D. *et al.* Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. **Chemosphere**, v. 80, n. 1, p. 1-6, 2010. Disponível em: <doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.011>

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*. **Mutat Res**, v. 259, n. 2, p. 127-132, 1991. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90046-o](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90046-o)>

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutat Res**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00065-2)>

GUEDES, C. M. *et al.* Toxicidade de *Ginkgo biloba L.*, sem aditivação e associado a excipientes artificiais, em tecido meristemático. Itajubá, MG: Stellata Editora, 2020. *E-book*. Disponível em: <https://stellata.com.br/wp-content/uploads/2020/05/Toxicidade-de-Ginkgo-biloba-L-sem-aditivac%CC%A7a%CC%83o-e-associado-a-excipientes-artificiais-em-tecido-meristema%CC%81tico.pdf>

GUPTA, B. P. *et al.* First report of hepatitis E virus viremia in healthy blood donors from Nepal. **Virus Disease**, v.27 p.324–326, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13337-016-0331-y>>

GUO, X.; LIU, F.; DENG, J.; DAI, P.; QIN, Y.; LI, Z.; WANG, B.; FAN, I. A.; WANG, Z.; ZHAO, Y. Electron-Accepting Micelles Deplete Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and Impair Two Antioxidant Cascades for Ferroptosis-Induced Tumor Eradication. **ACS Nano**, v. 14, n.11, p. 14715–14730, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00764>>

HAMIDI, M.R.; *et al.*, Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, v. 60, n. 1, p. 9 - 18, 2014.

HASSAN, M. *et al.* Biomonitoring detoxification efficiency of an algal-bacterial microcosm system for treatment of coking wastewater: Harmonization between *Chlorella vulgaris* microalgae and wastewater microbiome. **Science of the Total Environment**, v. 677, p. 120–130, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.304>>

HEATH, E. *et al.* Fate and effects of the residues of anticancer drugs in the environment. **Environmental science and pollution research**, v. 23, n. 15, p. 14687–14691, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7069-3>>

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.07.002>>

HUBE, S.; WU, B. Mitigation of emerging pollutants and pathogens in decentralized wastewater treatment processes: A review. **Science of The Total Environment**, v.779, p. 146545, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146545>>

HULGAN, T. *et al.* Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 1711–7, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/379776>>

ISHAQUE, A. B. *et al.* Assessment of individual and combined toxicities of four non-essential metals (as, cd, hg and pb) in the microtox assay. **Int. j. environ. res. public health**, v. 3, n. 1, p. 118-20, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph2006030014>>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11348-3**: Water quality – determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. International Organization for Standardization. Geneva, 2007.

JACOB, R. S. *et al.* A toxicity assessment of 30 pharmaceuticals using *Allivibrio fischeri*: a comparison of the acute effects of different formulations. **Environmental technology**, v. 37, p. 2760-2767, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1164249>>

JAIN, V. *et al.* Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. **J. Infect. Dis.**, v. 208, p. 1202–1211, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/infdis/jit311>>.

JERÔNIMO R. A.; *et al.* Escolha das espécies biomonitoras de efluente têxtil **R gest. sust. ambient.**, Florianópolis, v. 8, n. 3, p. 312-324, jul/set. 2019. DOI: 10.19177/rgsa.v8e32019312-324

JOS, A. *et al.* Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. **Toxicology in Vitro**, v.17, p.525-532, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00119-X)>

KAIRIGO, P. *et al.* Contamination of Surface Water and River Sediments by Antibiotic and Antiretroviral Drug Cocktails in Low and Middle-Income Countries: Occurrence, Risk and Mitigation Strategies. **Water**, v. 12, (5), 1376, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/w12051376>>

KAISER, L. E. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. **Environmental Health Perspectives**, v.106 (2), p.583-591, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1289/ehp.98106583>>

KIM, S. *et al.* PubChem 2019 update: improved access to chemical 871 data. **Nucleic acids research**, v. 47, p. 1102-1109, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>>

KNOLL, M. F. *et al.* Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 539-542, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300024>>

K'OREJE, K. O. *et al.* 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.** v. 437 p. 153-164, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.052>>

K'OREJE, K.O. *et al.* Occurrence Patterns of Pharmaceutical Residues in Wastewater, Surface Water and Groundwater of Nairobi and Kisumu City, Kenya. **Chemosphere**, v.149 p.238-244, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.095>>

KROEGER SMITH, M. B.; *et al.* Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors: Total energy of complexation as a predictor of

drug placement and activity. **Protein Science**, v. 4, p. 2203-2222, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pro.5560041026>>

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 58 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental). Centro Universitário Feevale. Nova Hamburgo - RS. 2009. Disponível em: <<https://aplicweb.feevale.br/site/files/documentos/pdf/29080.pdf>>

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v.75 p.417-434, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.Chemosphere.2008.11.086>>

KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment**. Annual Review of Environment and Resources, v.35(1), p.57–75, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-environ-052809-161223>>

KURÁS, L. Characterization of protein–DNA association in vivo by chromatin immunoprecipitation. In: Dickson RC, Mendenhall MD, editors. Signal transduction protocols, methods in molecular biology (Vol. 284). Totowa: Humana Press Inc.; p. 147–162, 2004.

LAGARTO, P. A., *et al.* Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts, **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>>

LANCASTER, S.; JUGULAM, M.; JONES, J.F. Herbicide Mode of Action. C715, Kansas State University, K-STATE Research and Extension, 2021. Disponível em: <<https://bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/C715.pdf>>

LATAŁA, A.; NĘDZI, M.; STEPNOWSKI, P. Toxicity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids towards algae. *Chlorella vulgaris*, *Oocystis submarina* (green algae) and *Cyclotella meneghiniana*, *Skeletonema marinoi* (diatoms). **Green Chem.**, v. 11, p. 580–558, 2009.

LEA-SMITH, D.; *et al.* Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1857, p. 247–255, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2015.10.007>>

LEITÃO, J. M. M. & SILVA, J. C. G. E. (2010). Firefly luciferase inhibition. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101: p.1-8, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.015>>

LEME, D. M.; DE ANGELIS, D. E. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquat Toxicol**, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.012>>

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water- a case study. **Mutation research**, v. 650, n. 1, p. 80-86,2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>>

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation research**, v. 682, p. 71-81, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>>

LI, T., XU, G., *et al.* The acclimation of *Chlorella* to high-level nitrite for potential application in biological NO_x removal from industrial flue gases. **Journal of Plant Physiology**, v.195: p.73-79, 2016. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.006>>

LI, W.C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193–201, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.015>>

LIANG, Y.; LIANG, N; YIN, L.; XIAO, F. Cellular and molecular mechanisms of xenobiotics-induced premature senescence **Toxicology Research**,v. 9, p. 669–675, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa073>

LIBRALATO, G.; *et al.* A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v.69: p.35-49, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>>

LU, Y.; *et al.* The toxicity assay of *Artemia salina* as a biological model for the preliminary toxic evaluation of chemical pollutants. **Advanced Materials Research**, v.726–731, p.230–233, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.726-731.230>>

LUO, Y., *et al.* A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v.473-474, p.619–641, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>>

MA, T. H.; *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res**. v. 334, p. 185-195, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)>

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p.355-381, 2008. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27395>> [Acessado no dia 11 de Julho de 2022.]

MARQUES, S. M.; SILVA, J. C. G. E. Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. **IUBMB Life**, v.61: p.6-17, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/iub.134>>

MARTÍN-ALONSO, S.; *et al* Novel RNase H Inhibitors Blocking RNA-directed Strand Displacement DNA Synthesis by HIV-1 Reverse Transcriptase, **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 7, 2022, p. 167507 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167507>>

MARTINS, A. C. R.; *et al*. Toxicity assessment of mastic and pomegranate tinctures using the *Artemia salina* bioassay. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e52010313751, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13751>>

MARZABAL, A. L. de F.; *et al*. Antiretroviral drugs: predicted environmental concentration and ecological risk Assessment in Sewage Treatment Plants in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e52111427595, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27595>>

MASOJÍDEK, J.; GIUSEPPE T. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. **Encyclopedia of Ecology**, p.2226-2235, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00830-2>>

MATSUMOTO, S. T.; *et al*. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028>>

MEDVEDEVA *et al*. Bioluminescent Bioassays Based on Luminous Bacteria. **Journal of Siberian Federal University. Biology**, v. 2, n. 4. p. 418-452, 2009.

MELLO, M.L.S; VIDAL, B. D C. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives. **Acta Histochem.** v.119. p - 603–609, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>>

MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Sci Total Environ**, v. 700, p. 134452, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>>

MESARIČ, T. *et al*. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in artemia salinarvae. **Aquatic toxicology**, v. 163, p. 121-129, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.014>>

MEYER, B.; *et al*. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v.45: p.31–34, 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>>

MINGUEZ, L.; *et al.* Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23: p. 4992–5001, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3662-5>>

MUKHERJEE, S.; *et al.* Imaging Viral Infection by Fluorescence Microscopy: Focus on HIV-1 Early Stage. **Viruses**, v. 13, p. 213, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v13020213>>

MULLINEAUX, C. W. Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. **Front Plant Sci**, v. 5 n. 7, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00007>>

NANNOU, C.; *et al.* Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity. **Science of The Total Environment**, v. 699, p. 134322, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134322>>

NASCENTES, A. L.; *et al.* Avaliação da toxicidade de lixiviado de aterro sanitário utilizando germinação de sementes de milho. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 21, n. 2, p. 20, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7867/1983-1501.2019v21n2p20-30>>

NYIRENDA, J.; MWANZA, A.; LENGWE, C. Assessing the biodegradability of common pharmaceutical products (PPs) on the Zambian market. **Heliyon**, v. 6, n. 10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05286>>

NEVES, K. A. D. S.; OLIVEIRA, J. V. A.; TEIXEIRA, A. Z. A. Uso de bioensaio com *Allium cepa* L. para avaliação de citotoxicidade de croton urucurana baill. **Revista Ibero-americana de humanidades, Ciências e Educação**, v. 6, n. 12, p. 07, 12/31 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.29327/217514.6.12-6>>

NGUMBA, E.; GACHANJA, A.; TUHKANEN, T. Occurrence of selected antibiotics and antiretroviral drugs in Nairobi River Basin, Kenya. **Science of the Total Environ**, v.539: p.206–213, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.139>>

NGUMBA, E. **Occurrence and control of selected antibiotics and antiretroviral drugs in urban hydrological cycles**. 95. 2018

NIE, X.; *et al.* Response of the freshwater alga *Chlorella vulgaris* to trichloroisocyanuric acid and ciprofloxacin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27: p.168-173, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1897/07-028.1>>

NTUNGWE, N. E.; *et al.* Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Curr Pharm Des**, v. 26, n. 24, p. 2892-2908, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138161282666200406083035>>

NUNES, B. S.; *et al.* Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v.144: p.453–462, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>>

NUNES-HALLDORSON, V. S.; DURAN, N. L. Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 91-96, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000200001>>

OLARU, O.T., *et al.* Anticancer potential of selected Fallopiia Adans species. **Oncology Letters**, v. 10, p. 1323-1332, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/ol.2015.3453>>

OLIVEIRA, G. A. R.; *et al.* A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. **Chem Biol Interact.** v.291, p.171-179, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.026>>

ONBASILI, D.; DUMAN, F. (2010). Acute toxicity of some insecticides on Artemia salina and Daphnia magna. **Fresenius Environmental Bulletin.** v.19 (11): p.2608-2610, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299240957_Acute_toxicity_of_some_insecticides_on_artemia_salina_and_daphnia_magna>

ONWUAMAH, C. K. *et al.* Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. **Plos one**, v. 9, n. 3, p. 1-7, 2014

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for testing chemicals freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. 201. Paris: OECD Publishing, 2011. *E-book*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>>

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water research**, v 46, n 5, p. 1349-1363, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>>

PARVAN, L. G.; *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000544>>

PARVEZ, B. S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v.32, p.265 – 268, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022>>.

PAVLAKI, M. D.; *et al.* . Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, p. 99–110, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.010>>

PRASSE, C.; *et al.* Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? **Environmental science & technology**, v.44, p.1728-1735, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es903216p>>

PRASSE, C.; *et al.* Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. **Water research**, v. 87, p.237-270, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.023>>

PENTA HIV Guidelines Writing Group. PENTA HIV first and second-line antiretroviral treatment guidelines, Padova, 2019. *E-book*. Disponível em: <https://paediatri.dk/images/dokumenter/vejl_hoering_2021/Bilag_1_PENTA_HIV-1st-2nd-Line-ARV-Treatment-Guidelines-2019_v1.0_20191109.pdf>

PEREIRA, J. L.; *et al.* Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 455–463, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-009-0300-y>>

PERSOONE, G.; WELLS, P. G. *Artemia* in aquatic toxicology: a review. **Artemia Research and its Applications**. Vol. 1. Wetteren, Belgium: Universa Press, 1987.

RAJ, A.; *et al.* Kinetic and thermodynamic investigations of sewage sludge biochar in removal of Remazol Brilliant Blue R dye from aqueous solution and evaluation of residual dyes cytotoxicity. **Environmental Technology & Innovation**. v. 23, p. 101556, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101556>>

RAJABI, S. *et al.* *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles, **Daru journal of pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 20, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>>

RAJI, J. I.; ONWUAMAH, C. K.; ODEIGAH, P. G. C. Artemisinin-Based Combination Therapy Depressed Mitosis and Induced Chromosome Aberration in Onion Root Cells. **Journal of Toxicology**, v. 13, p. 1-13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/4671326>

REN, J.; *et al.* The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with 9-chloro-TIBO: lessons for inhibitor design, **Structure**, v. 3, n. 9, p. 915–926, 1995. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00226-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00226-x)

RIBO, J. M. Interlaboratory Comparison Studies of the Luminescent Bacteria Toxicity. Bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.12, n. 4, p.283–294, 1997. Disponível em: <https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902141905826462>

RICO, A.; *et al.* Pharmaceuticals and other urban contaminants threaten Amazonian freshwater ecosystems. **Environment International**, v. 155, p. 10670, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106702>>

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v.111: p.61, 1979. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>>

RITZ, C.; *et al.* Dose-Response Analysis Using R. **PLoS ONE**, v. 10: e0146021, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>>

RODRIGUES, G. Z. P.; DALZUCHIO, T.; GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta toxicol. argent**, v. 24, n. 2, p. p. 97-104, 2016.

ROEDE, J. R.; MILLER, G. W. Diquat. **Encyclopedia of Toxicology**, v.2. p. 202-204, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00137-8>>

SAFI C.; *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review, **Renew. Sustain. Energy Rev**, v. 35, p. 265-278, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04>>

SANGKHAM, S. A review on detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in light of the current knowledge of treatment process for removal of viral fragments. **J. Environ. Manage.** 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113563>>

SASIDHARAN, S.; *et al.* Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. seed methanolic extract. **Pharmacognosy Res**, v. 2, n. 4, p. 215-0, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0974-8490.69107>>

SCHOEMAN, C.; DLAMINI, M.; OKONKWO, O. J. The impact of a Wastewater Treatment Works in Southern Gauteng, South Africa on efavirenz and nevirapine discharges into the aquatic environment, **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 2. p. 95-106, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.09.001>>

SHEA, D. Transport and Fate of Toxicants in the Environment. **A Textbook of Modern Toxicology**, v. 27 p. 479–499, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471646776.ch27>>

SHIMADA, M.; *et al.* Specificity of priming reaction of HIV-1 reverse transcriptase, 2'-OH or 3'-OH. **Biol. Chem**, v. 269, n. 3925, 1994.

SILVA, A.; *et al.* A. S. Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*. **Environmental technology**, v.35 p.3124-3129, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2014.932438>>

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>>

SILVA, S. R.; *et al.* Toxicity for Aquatic Organisms of Antiretroviral Tenofovir Disoproxil. **Journal of Environmental Protection**, v. 10 p. 1565-1577, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.4236/jep.2019.1012093>>

SOLOVCHENKO, A.; *et al.* Taras. Approaches to rapid screening of pharmaceutical xenobiotic effects on microalgae via monitoring of photosynthetic apparatus condition. **Journal of Applied Phycology**, v. 34. p. 1-9, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02660-4>>

SOODAN, R.; KATNORIA, J.; NAGPAL, A. *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: An Efficient Test System for Evaluating Genotoxicity of Agricultural Soil. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v3, n. 8, p. 245-250, 2014. ISSN (Online): 2319-7064

SRAIN, H. S.; BEAZLEY, K. F.; WALKER, T. R. Pharmaceuticals and personal care products and their sublethal and lethal effects in aquatic organisms. **Environmental Reviews**, v. 29, n. 2, p. 142-181, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/er-2020-0054>>

SRIRAM, D.; YOGESHWARI, P.; KISHORE, M. R. Synthesis and anti-HIV activity of nevirapine prodrugs. **Pharmazie**, v. 61, n. 11, p. 895-7, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17152978/>>

STEWART, M.; *et al.* A survey of emerging contaminants in the estuarine receiving environment around Auckland, New Zealand. **Science of The Total Environment**, v. 468-469, p. 202–210, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.039>>

SUAREZ, S.; LEMA, J. M.; OMIL, F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2138–2146, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.015>>

TANDUKAR, S.; *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater, river water, and hospital wastewater of Nepal, Nepal. **Science of The Total Environment**, v.824, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153816>>

TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. **Chemosphere**, v. 115, p. 95–99, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.011>>

THE TENORES STUDY GROUP. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a

multicentre retrospective cohort study. **Lancet Infect Dis**; v. 16, p. 565–75, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00536-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00536-8)>

TOOLARAM, A. P.; KÜMMERER, K.; SCHNEIDER, M. Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: a focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 760, p. 18-35, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.02.001>>

TURAN, M.; MAMMADOV, R. Evaluation of the Toxicity Activity of Bioactive Compounds of Some Geophytes against Brine Shrimp (*Artemia salina* L.), **Acta Aquatica Turcica**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.22392/actaquatr.791297>

UNITED NATIONS. **GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals**. 8th Revised Edition, United Nations, New York, 2019. E-book. Disponível em: <<https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en>>

VAN DER MERWE, *et al.* The Role of Functional Excipients in Solid Oral Dosage Forms to Overcome Poor Drug *Dissolution and Bioavailability*. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 393. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050393>>

VAŇKOVÁ, Magdaléna. **Biodegradability analysis of pharmaceuticals used in developing countries; screening with OxiTop® - C**. Doctoral thesis (Degree Programme in Environmental Engineering) - Tampere University of Applied Sciences, Finland, 2010. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/38021525.pdf>>

VENKATESWARA R.; *et al.* Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 227-232, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00244-006-0226-9>>

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. **Science of The Total Environment**, v. 429, p.123–155, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>>

VIRAMUNE: Tablets/(nevirapine) oral suspension, U.S. prescribing information. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. Ridgefield, CT 06877 USA. 2019. 1 bula de remédio. Disponível em: <<https://docs.boehringer-ingelheim.com/Prescribing%20Information/PIs/Viramune/Viramune.pdf>>

VONARX, E. J.; *et al.* DNA repair in higher plants. **Mutat Res**, 400, n. 1-2, p. 187-200, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(98\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(98)00043-8)

WALENGA, N.J.; NOMNGONGO P.N. Occurrence of pharmaceuticals in the environmental waters: African and Asian perspectives. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 4, p. 50-66, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.encco.2021.11.002>>

WANG, D., et al, Selecting optimal pharmaceutical excipient formulation from life cycle assessment perspectives: A case study on ibuprofen tablet formulations, **Journal of Cleaner Production**, v. 292, p. 126074, 2021, Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126074>>

WANG, L., et al. Acclimation process of cultivating *Chlorella vulgaris* in toxic excess sludge extract and its response mechanism. **The Science of the total environment**, v. 628-629, p. 858–869, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.020>>

WEYMAN, G. S.; et al. Aquatic toxicity tests with substances that are poorly soluble in water and consequences for environmental risk assessment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 31, p. 1662–1669, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.1856>>

WHITTON, F. J. S.; et al. Understanding global patterns in amphibian geographic range size: does Rapoport rule? **Global Ecology and Biogeography**, v. 21, n. 2, p. 179–190, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00660.x>>

WILKINSON, J. L.; et al. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 119, n. 8, p. e2113947119, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2113947119>>

WIRZ, K. C.; STUDER M.; STRAUB, J. O. Environmental risk assessment for excipients from galenical pharmaceutical production in wastewater and receiving water, **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 1, p. 28-35, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2015.08.004>>

WLODKOWIC, D.; KARPIŃSKI, T. Live-Cell Systems in Real-Time Biomonitoring of Water Pollution: Practical Considerations and Future Perspectives. **Sensors**, v. 21, p. 7028, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/s21217028>>

WOOD, T. P.; DUVENAGE, C. S. J.; ROHWER, E. The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water. **Environmental pollution**, v. 199, p. 235-243, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.030>>

WOOD, T. P.; et al. The chlorination behaviour and environmental fate of the antiretroviral drug nevirapine in South African surface water. **Water Res**, v. 1, n. 104, p. 349-360, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.038>>

XI, J.; et al. Acute toxicity of triflumizole to freshwater green algae *Chlorella vulgaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 158, p. 135-142, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.002>.

XU, X. et al. Toxic assessment of triclosan and triclocarban on *artemia salina*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 95, n. 6, p. 728–733, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1641-2>

YADAV, A. R.; MOHITE, S. K. Toxicological Evaluation of Psidium guajava Leaf Extracts using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, v. 12, n. 4, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.5958/0975-4377.2020.00042.7>>

YOUNG, W; BUTLER, R; JOHNSON, I. Review of microtox toxicity test. Environment agency. Bristol: National Rivers Authority, 1991. Disponível em: <<http://www.environmentdata.org/archive/ealit:2245>>

ZAKRZEWSKI, S. F. **Environmental toxicology**. 3rd edition. New York: Oxford University Press, 2002. Disponível em: <http://pustaka.unp.ac.id/file/abstrak_kki/EBOOKS/Environmental%20Toxicology%203rd%20edition.pdf>

ZHANG, M.; *et al.* Differences in responses to darkness between *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa*. **J Freshw Ecol**, v. 22, n. 1, p. 93-99, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02705060.2007.9664149>.

APÊNDICES

A – Manutenção e crescimento de cultura *C. vulgaris*

Manutenção de cultivo de *C. vulgaris* no Lab. de Águas da FaFar

A culturas não axênicas foram mantidas em câmara de germinação de 0,025 m² à temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo 12h claro/12h escuro, sob intensidades luminosas com radiância entre 40 - 50 μmol.m⁻².s⁻¹ (CETESB, 2004). Não foram utilizados antimicrobianos e nem agentes tamponantes nos meios de cultivo.

Foi preparado o meio de cultura BG-11 diluído (Tabela 3). O meio de cultura diluído foi transferido para erlenmeyer de 2000 mL, tampado com rolha de gaze e algodão hidrófobo e autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

Tabela 3 – Composição do volume de 1000 mL meio de cultura BG-11 segundo Rippka; Deruelles; Waterbury (1979) diluído suplementado

Solução Estoque	Componentes	g/L	Volume (mL)
1	Na ₂ Mg EDTA	0,1	10 mL
	Citrato Férrico de amônia	0,6	
	Ácido cítrico. H ₂ O	0,6	
	CaCl. 2H ₂ O	3,6	
2	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	7,5	10 mL
3	K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O ou K ₂ HPO ₄ anidro	4,0 ou 3,057	10 mL
4	NaCO ₃	---	0,02 g
5 Solução de micronutrientes	H ₃ BO ₃	2,86	1 mL
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,222	
	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,079	
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,050	
	NaMoO ₄ . 2H ₂ O ou MoO ₃ (85%)	0,018	
6	NaNO ₃ (suplementado com N)	---	1,5 g

Fonte: Adaptado de Rippka; Deruelles; Waterbury (1979)

Curva de crescimento da espécie *C. vulgaris*

A curva de *C. vulgaris* em seu respectivo meio BG-11 foi determinada a partir de triplicata de 250 mL de cultura, incubadas. A cada 48 horas durante 21 dias foram retiradas alíquotas de dois mL, às quais foram adicionadas de duas gotas de Lugol 2%. Após homogeneização, transferiu-se 1 mL para a câmara de contagem Fuchs-Rosenthal para sedimentação por 10 minutos e procedeu-se a contagem das células em microscópio ótico com objetiva de 40 vezes e aumento total de 400 vezes. Todos os campos foram contados e em cada campo contou-se o número total de células presentes ou até que se obtivesse 400 células. A densidade da cultura (células/mL) foi estimada multiplicando-se o número total de células contadas por 80.000, que é o fator de conversão utilizado para câmara de Fuchs-Rosenthal 0,0625 mm² (CETESB 2004). A curva de crescimento foi estabelecida a partir da média do número de células (células/mL) em função do tempo de cultivo. Após a determinação da curva de crescimento, foram calculadas a taxa de crescimento μ (μ /dia) por meio da Equação 1 e o tempo de geração G G/dia (Equação 2) propostos por Fogg e Thake (1987)^e da cultura de *C. vulgaris*. Utilizou-se a contagem média do número de células final e inicial (N e N₀ em células/mL) da triplicata das culturas de *C. vulgaris* monitoradas nos tempos final e inicial (t e t₀ em dias) da fase exponencial.

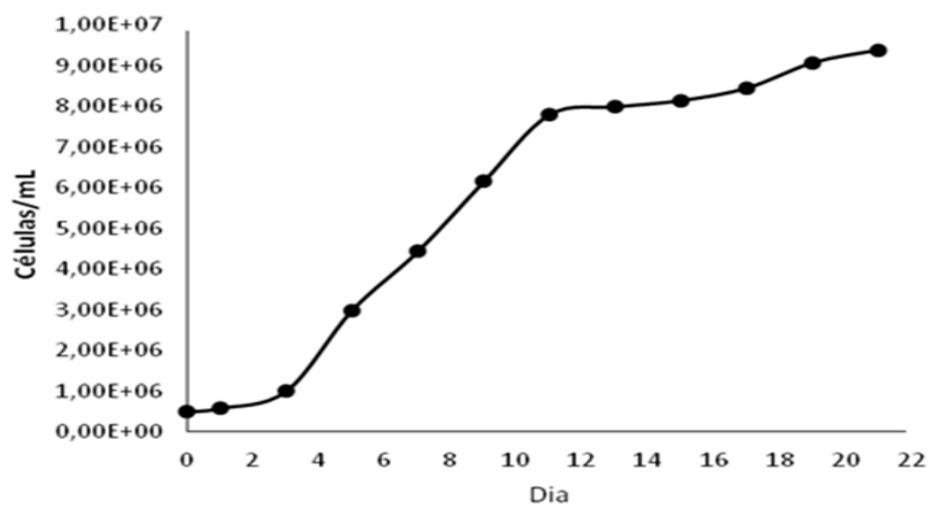
$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0) \quad \text{Equação 1}$$

$$G \text{ (G/dia)} = \ln 2 / \mu \quad \text{Equação 2}$$

A curva de crescimento de *C. vulgaris* pode ser observada na Figura 11. A microalga *C. vulgaris* apresentou taxa de crescimento de 1,68/ dia. Nas condições de cultivo, a fase de crescimento exponencial ocorreu entre o terceiro ao décimo primeiro dia, quando a cultura entrou na fase estacionária.

^e FOGG, G. E. & THAKE, 1987. Algae cultures and phytoplankton ecology, 3.ed The University of Wisconsin Press, Ltd., London, 269p.

Figura 9 – Curva de crescimento de *C. vulgaris* no Laboratório de Água da Faculdade de Farmácia/UFMG



Fonte: Laboratório de Água da Faculdade de Farmácia/UFMG (2017)

B - Ensaios preliminares - Mortalidade (imobilidade) de náuplios de *A. salina* expostos à NVP solubilizada em DMSO 1% v/v

Os ensaios preliminares com *A. Salina* foram realizados com DMSO, conforme recomendado na literatura, em função da baixa solubilidade de NVP em água e salina. Verificou-se em ensaio preliminar que quando os náuplios foram expostos à DMSO 1% v/v não houve diferença significativa na sua mortalidade em relação ao grupo controle, corroborando os dados de atoxicidade do DMSO para a espécie nessa concentração. Quando os náuplios foram expostos às concentrações maiores de DMSO (2% e 3% v/v), a mortalidade apresentada diferiu em relação ao grupo controle, sendo significativamente maior. Definiu-se assim o limite de concentração de DMSO a ser utilizado no teste, ou seja, a concentração máxima de NVP seria aquela solúvel em DMSO a 1% v/v em salina 3%.

Na tréplica dos testes de NVP solubilizada em DMSO que levou a uma relação DMSO/salina de 1%, utilizou-se a série de concentrações de 40,02 mg/L, 80,04 mg/L, 120,06 mg/L, 160,08 mg/L e 200,10 mg/L. Observou-se que todos os náuplios expostos à NVP morreram. Testou-se uma segunda série de concentração de 10,0 mg/L, 15,0 mg/L, 20,0 mg/L, 25,0 mg/L, 30,0 mg/L, 40,0 mg/L e 50,0, de NVP. Nesse caso verificou-se que não houve mortalidade na concentração 10,0 mg/L e todos morreram na concentração de 50,0 mg/L de NVP.

A mortalidade média dos náuplios de *A. salina* nas concentrações entre 15 mg/L e 40,0 mg/L foi de 30% a 90%. Assim, as concentrações de NVP em DMSO 1% v/v que provocaram a mortalidade (imobilidade) de 50% dos náuplios de *A. salina*, (CE50%) com intervalo de confiança de 95% e 5% de significância, foram 19,04 mg/L, calculada pelo método estatístico *Trimmer Spearman-Karber*. Em seguida, foram utilizadas as concentrações teóricas 7,04 mg/L, 14,08 mg/L, 21,12 mg/L, 42,24 mg/L e 68,99 mg/L para determinar a CE50% NVP pelo método *Trimmer Spearman-Karber* em água. O valor de CE50% foi 26,34 mg/L. Esse valor foi utilizado para proceder as diluições de NVP em água para os ensaios posteriores, evitando o uso de solventes orgânicos nos ensaios.

O solvente orgânico DMSO aumentou a permeabilidade de membranas lipídicas, o que pode explicar o efeito observado (mortalidade) ocorrer em concentração de NVP menor quando solubilizada nesse solvente que em água. Ao aumentar a permeabilidade da membrana celular, o DMSO provoca aumento na absorção de NVP. Por esta razão, foi abolido o uso de solventes orgânicos nos testes e os ensaios posteriores foram realizados com NVP solubilizada em água.

C - Caracterização físico-química das soluções/suspensões de nevirapina, dos excipientes e da formulação para o ensaio com *A. fischeri*

A caracterização das soluções/suspensões de nevirapina, dos excipientes e da formulação para o teste com *A. Fischeri* pode ser verificada na Tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização das soluções/suspensões de nevirapina (NVP), dos excipientes e do medicamento à base de nevirapina em comprimidos do ensaio de inibição de bioluminescência para *A. fischeri*

Matéria-prima	Concentração nominal da amostra (mg/L ⁻¹)	pH	Turbidez (NTU) e Aspecto	Salinidade (mg/L ⁻¹)	Condutividade (µS)	Oxigênio dissolvido (%)
Nevirapina	61	7	1,37 - Límpida	2	1,7	20,9
Glicolato amido sódico	144,0	6	1,28 - Límpida	20,0	17,9	20,9
Celulose microcristalina	133,0	6	12,2 - Turva	1,0	1,1	21,0
Lactose <i>spray dried</i>	169,0	6	1,5 - Límpida	82,0	76,0	20,9
Polivinilpirrolidona (PVP)	130,0	6	1,28 - Límpida	3,0	3,1	21,1
Dióxido de silício coloidal	121,0	6	3,98 - Turva	3,0	2,3	20,9
Estearato de magnésio	125,0	6	140,0 - Turva	4,0	3,2	21,1
Formulação de NVP	496,0 (62 mg de NVP.L ⁻¹) ^(a)	6	Maior que 1000	4,0	3,7	20,9

Notas: (a) A concentração de 200 mg de NVP corresponde à dissolução de 25% do peso médio teórico de comprimidos.

Fonte: Dados da autora

D – Sumarização dos resultados dos Estudos I e II da tese

A Figura 10 sintetiza a avaliação dos efeitos tóxicos para os organismos aquáticos e a interferência dos excipientes nos efeitos observado para o IFA.

Figura 10 - Comparação da toxicidade aquática do IFA nevirapina isolado e na presença de excipientes de um medicamento à base de NVP para os organismos aquáticos

Espécies	Substância testada (Nevirapina)	CE10% (mg/L ¹)	CE50% (mg/L ¹)	Toxicidade aguda para a espécie (10 <CE50% ≤100 mg/L)	CE 50% de Interesse ambiental?	Possível interferência de excipientes?
<i>Chlorella vulgaris</i>	IFA	18,22 [13,94 - 22,50]	24,90 [21,52 - 28,28]	Não	Sim	Não houve diferença estatística entre CE ₅
	Medicamento	9,71 [5,95 - 13,46]	19,52 [13,98 - 25,05]	Não	Sim	
<i>Artemia salina</i>	IFA	17,12 [15,61 - 18,64]	27,77 [25,89 - 29,65]	Não	Sim	Sim, porque diferença entre CE ₅
	Medicamento	Maior que 50,18 mg/L	Maior que 50,18 mg/L	Não	Indefinido	
<i>Alivivbrio fischeri</i>	IFA	13,63 [10,12 - 16,61]	22,18 [19,92 - 24,44]	Não (a)	Sim	Sim, porque houve diferença estatística entre CE ₅
	Medicamento	6,49 [4,65 - 8,32]	12,40 [10,97 - 13,84]	Sim(a)	Sim	

Nota: (a) Conceito não se aplica à espécie segundo *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals – GHS (UNITED NATIONS, 2011)*

Fonte: Dados da autora

A figura 11 sumariza a avaliação dos efeitos citogenéticos de NVP para *A. cepa* e a possível modificação desses efeitos em função dos excipientes.

Figura 11 - Comparação da toxicidade citogenética do IFA nevirapina isolado e na presença de excipientes de um medicamento à base de NVP para *A. cepa*

Substância testada	[Nevirapina mg/L]	Efeitos observados											Possível interferência de excipientes?	
		Citotoxicidade			Genotoxicidade				Mutagenicidade					
		Índice de Germinação comparado ao CN	Crescimento radicular comparado ao CN	Índice Mitótico comparado ao CN e ao MMS	Índice de Aberrações Cromossômicas comparado ao CN, MMS e TFL		Aderências Cromossômicas comparado ao CN e TFL		Índice de Anormalidades Nucleares na região meristemática comparado ao CN	Índice de Mutagenicidade comparado ao CN				
IFA	6,42 ± 0,58				Maior	Similar	Similar	Menor			Maior	Similar	Similar	Maior
Medicamento	5,45 ± 0,44	Menor	Menor	Maior	Menor	Maior	Similar	Similar	Maior	Similar	Maior	Similar	Maior	
IFA	9,54 ± 0,87	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Similar	Similar	Maior	Similar	Maior	Similar	Maior	Pouco provável.
Medicamento	11,20 ± 1,13	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Similar	Similar	Maior	Similar	Maior	Similar	Maior	
IFA	17,73 ± 1,31	Similar	Menor	Maior	Menor	Maior	Similar	Similar	Maior	Similar	Maior	Similar	Maior	Pouco provável
Medicamento	17,65 ± 1,29	Similar	Menor	Maior	Similar	Maior	Similar	Similar	Maior	Similar	Maior	Similar	Maior	

Nota: CN – controle negativo; MMS – metilmetanossulfonato TFL – tiazofurazina

Fonte: Dados da autora