



## **DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES PRESENTES COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN MUESTRAS AMBIENTALES Y LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

**Lesly Anniled Paradina Fernández**

Doctorado en Ciencias Biológicas

Directora: Dra. María Julia Culzoni; co-directora: Dra. Romina Brasca

Lugar de realización: Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría, Cátedra de Química Analítica I Dr. Víctor E. Mantovani, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 11 de marzo de 2020

lesly.paradina@gmail.com

### Resumen

Los antirretrovirales son fármacos empleados en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que constituyen una clase de contaminantes emergentes y en las últimas décadas han recibido atención debido a los potenciales efectos negativos que pueden provocar en el ambiente. Estos fármacos son consumidos en altas dosis y, posteriormente, eliminados del cuerpo sin sufrir alteraciones en su estructura química o como metabolitos, y descargados a los ecosistemas acuáticos debido a su ineficiente remoción durante los procesos de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, una de las principales preocupaciones relacionadas con la liberación de estas drogas en el ambiente resulta de los potenciales daños que puede ocasionar, tales como resistencias virales y/o toxicidad en organismos acuáticos. Por consiguiente, se hace imprescindible el desarrollo de metodologías sencillas y asequibles para el monitoreo de estos contaminantes a nivel ambiental, así como la evaluación de la posible bioacumulación en organismos acuáticos expuestos a estos antirretrovirales y la potencial toxicidad asociada. Por lo tanto, el desarrollo de esta tesis involucró, en una fase inicial, la caracterización fisicoquímica de las drogas antirretrovirales lamivudina, estavudina, zidovudina, abacavir, efavirenz y nevirapina. La caracterización ácido-base de cada analito se realizó mediante titulaciones espectrofotométricas UV-Vis y el empleo del algoritmo quimiométrico MCR-ALS, obteniéndose los valores de  $pK_a$ . A partir de las propiedades ácido-base de estos analitos, se desarrolló un método de cuantificación simultánea de estas drogas en muestras ambientales de agua por FIA-DAD y empleando el algoritmo quimiométrico MCR-ALS. Los resultados obtenidos mostraron la cuantificación exacta de cada uno de ellos, inclusive en presencia de componentes desconocidos presentes en las matrices ambientales evaluadas.

Posteriormente, se procedió al desarrollo de otra metodología de cuantificación basada en espectroscopia de fluorescencia molecular y degradación del abacavir inducida por irradiación UV. Inicialmente, y con el objetivo de maximizar la señal de fluorescencia, se determinaron las condiciones experimentales óptimas a partir de un diseño de experimentos empleándose la metodología de superficie de respuesta. Una vez establecidas estas condiciones de trabajo, se continuó con el desarrollo del método analítico registrándose dos tipos de datos: matrices de excitación-emisión de fluorescencia adquiridas una vez concluida la irradiación UV (datos de segundo orden) del analito, y matrices de excitación-emisión de fluorescencia registradas a distintos tiempos de irradiación (datos de tercer orden), que se procesaron utilizando los algoritmos MCR-ALS y PARAFAC. Los resultados obtenidos para las muestras de validación y muestras ambientales de agua evaluadas mostraron habilidades predictivas semejantes para ambos algoritmos empleando ambos tipos de datos, y la principal ventaja de los datos de tercer orden con respecto a los de segundo orden estuvo asociada a mejoras en las cifras de mérito analíticas. Posteriormente, se realizó un estudio de toxicidad aguda en renacuajos *Rhinella arenarum* para determinar la posible bioacumulación de estos antirretrovirales en organismos expuestos a diferentes niveles de concentración. Por lo tanto, se procedió a la cuantificación de las concentraciones de antirretrovirales absorbidos por los renacuajos empleando dos metodologías analíticas, UHPLC-DAD para niveles de exposición subletales y UHPLC-MS/MS para niveles de exposición ambiental. Para el caso de la metodología por UHPLC-MS/MS se establecieron previamente las condiciones experimentales óptimas que permitieran el elevado nivel de sensibilidad requerido mediante diseño experimental y optimización por la metodología de superficie de respuesta. Para finalizar, se evaluaron los efectos toxicológicos producidos por estas drogas durante el estudio de toxicidad a concentraciones subletales mediante el análisis de los biomarcadores enzimáticos AchE y GST, obteniéndose resultados correlacionados entre la bioacumulación y la toxicidad producida por estos antirretrovirales. En todos los casos evaluados se observó bioacumulación, siendo el efavirenz y la nevirapina los analitos mayormente absorbidos por los renacuajos. En el caso de la nevirapina, se observaron mayores niveles de toxicidad, lo que se vio reflejado en el incremento de la actividad de la enzima GST.

#### Abstract

#### **DEVELOPMENT OF ANALYTICAL STRATEGIES FOR DETERMINATION OF ANTIRETROVIRAL DRUGS AS EMERGING CONTAMINANTS IN ENVIRONMENTAL SAMPLES AND TOXICOLOGICAL EVALUATION IN BIOLOGICAL SAMPLES**

Antiretrovirals are pharmaceuticals used in the treatment of human immunodeficiency virus, which constitute a class of emerging pollutants due to their occurrence and potential negative effects on the environment.

Initially, a physicochemical characterization of the antiretroviral drugs lamivudine, stavudine, zidovudine, abacavir, efavirenz, and nevirapine was performed. Subsequently, a simultaneous quantitation method of these drugs was developed in water environmental samples using FIA-DAD and the chemometric algorithm MCR-ALS, achieving the accurate quantitation of each analyte, even in the presence of unknown interferences inherent to the environmental matrices.

Additionally, the development of a quantitation methodology based on molecular fluorescence spectroscopy and abacavir degradation induced by UV irradiation was performed, from the generation of second and third-order data and subsequent data analysis by MCR-ALS and PARAFAC. The results obtained in this study showed similar predictive ability between both algorithms using both types of data, and improvements in the analytical figures of merit for third-order data with respect to second-order data.

With the goal of evaluating the possible bioaccumulation and toxicological effects of these antiretrovirals in aquatic organisms, an acute toxicity study was carried out in *Rhinella arenarum* tadpoles to determine the possible bioaccumulation of these antiretrovirals in organisms exposed to different concentration levels (sublethal and environmental). The results obtained showed potential bioaccumulation of these emerging pollutants, being efavirenz and nevirapine the analytes mostly absorbed by tadpoles, and associated toxicological effects were observed from increases in the activity of the GST enzyme.