

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

**JÚLIA ALVES LUZZI**

**Avaliação de efeitos subletais de crack (cocaína) em**  
**cenários de acidificação oceânica**

**SANTOS/SP**

**2021**

**JÚLIA ALVES LUZZI**

**Avaliação de efeitos subletais de crack (cocaína) em  
cenários de acidificação oceânica**

Dissertação apresentada à  
Universidade Santa Cecília como parte  
dos requisitos para obtenção de título  
de mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Sustentabilidade de  
Ecossistemas Costeiros e Marinhos,  
sob a orientação do Prof. Dr. Camilo  
Dias Seabra Pereira e coorientação da  
Dra. Lorena da Silva Souza.

**SANTOS/SP**

**2021**

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

363.7394 Alves Luzzi, Júlia.  
L994a Avaliação de efeitos subletais de crack (cocaína) em cenários de acidificação oceânica / Júlia Alves Luzzi  
- 2021.  
\_f.:il

Orientador: Camilo Dias Seabra Pereira  
Coorientador: Lorena da Silva Souza

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2021.

1. CO<sub>2</sub>. 2. Biomarcadores. 3. pH.  
I. Dias Seabra Pereira, Camilo. II. Da Silva Souza, Lorena III.  
Avaliação de efeitos subletais de crack (cocaína) em cenários de acidificação oceânica.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meu pais que sempre me deram oportunidades de fazer e estar a onde eu queria estar.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Marcello e Cida, por sempre acreditarem em mim e no que eu escolhi para a vida e por sempre estarem ao meu lado me ajudando em todos os momentos. E a minha irmã de quatro patas, Brisa, que só me passa amor.

Aos meus familiares e amigos por sempre estarem comigo e me dando tanto suporte e carinho, que mesmo sem saberem me ajudaram só de estarem ao meu lado e confiando na minha capacidade.

Ao Estrella por estar ao meu lado e não deixar com que eu desista, me dando todo apoio possível. E por aguentar meu mau humor e meus momentos pessimistas em relação ao que eu escolhi. Sem você muitas coisas não teriam chegado aonde chegaram.

A Letícia Onofre e Danielle Garcia por sempre estarem ao meu lado tanto no laboratório quanto na vida, obrigada por todo o apoio braçal e mental que vocês me deram nesse período. Paloma Choueri, Fábio Pusceddu, Caio Nobre, Mayana Fontes e Mariana Aliceda por sempre me ajudarem.

E aos meus orientadores, professor Camilo Dias Seabra Pereira e Lorena da Silva Souza, por confiarem no meu trabalho e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço aos laboratórios de ecotoxicologia da UNISANTA, UNIFESP e UNESP pelo apoio, em especial o professor Denis Abessa por ceder o laboratório de ecotoxicologia da UNESP para que as análises de biomarcadores pudessem acontecer.

E a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para que eu conseguisse, de alguma forma, realizar esse trabalho tão incrível e especial.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimento a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo através de concessões (2015 / 17329-0) e (2018 / 18456-4). Pereira C.D.S. agradece ao CNPq (CNPQ 409187 / 2016-0) pela bolsa de produtividade. DelValls T.A. agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade nº 305734 / 2018-0. Souza L.S. agradece ao Programa Erasmus Mundus pela bolsa de doutorado.

## RESUMO

Desde 1750 o pH da água do mar vem diminuindo, e essa diminuição é denominada acidificação oceânica. Segundo a literatura científica, a principal causa da acidificação oceânica é o aumento do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), gás de efeito estufa, proveniente da queima de combustíveis fósseis. Em adição a esta problemática, nas zonas costeiras há o aumento do despejo de esgoto doméstico contendo drogas ilícitas, como cocaína e crack. Trabalhos já observaram a presença de cocaína no ambiente marinho, podendo acarretar efeitos deletérios em organismos marinhos. A hipótese deste trabalho é de que a acidificação associada ao enriquecimento de CO<sub>2</sub> no ambiente marinho provocará uma modificação na toxicidade da droga ilícita crack. O objetivo é avaliar efeitos subletais da droga ilícita crack combinada com a acidificação pelo enriquecimento de CO<sub>2</sub> nos ecossistemas marinhos. Foi determinada a toxicidade da cocaína em sua forma não ionizada (crack) em diferentes cenários de pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0) relacionados ao aumento de CO<sub>2</sub> através da avaliação de efeitos subletais em organismos marinhos a partir de análises de biomarcadores de exposição (GST, GPx e GSH) e de efeito (AChE e estabilidade da membrana lisossomal). A análise do biomarcador GST demonstrou um aumento na atividade enzimática no pH 6.5 (0,5, 5 e 50 µg/L de crack) e no pH 6.0 (5 e 50 µg/L de crack), levando a um mecanismo de proteção celular. No biomarcador de neurotransmissão AChE houve uma inibição da enzima em 48h nos pHs 7.5, 7.0 e 6.5, e um aumento da produção enzimática no pH 6.0. Em 96h houve uma inibição no pH 7.0 e um aumento nos pHs 6.5 e 6.0. A inibição da atividade de AChE podem resultar na perda da biodiversidade e o aumento da AChE pode levar a apoptose celular. Na estabilidade da membrana lisossômica houve uma inibição na retenção do corante vermelho neutro conforme a diminuição do pH e aumento das concentrações de crack, podendo resultar no comprometimento da imunidade e da fisiologia dos organismos, entre outras. Portanto, tanto os estresses relacionados ao crack e redução de pH isoladamente, quanto em combinação observados neste estudo podem acarretar na diminuição recursos alimentícios aos seres humanos e diminuição da biodiversidade.

**Palavras-chave:** CO<sub>2</sub>. Biomarcadores. pH. Acidificação. *Perna perna*.

## ABSTRACT

### Evaluation of sublethal effects of crack-cocaine in oceanic acidification scenarios

Since 1750, the pH of seawater has been decreasing, and this decrease is called ocean acidification. According to scientific literature, the main cause of oceanic acidification is the increase in carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), a greenhouse gas, resulting from the burning of fossil fuels. In addition to this problem, in coastal areas there is an increase in the discharge of domestic sewage containing illicit drugs, such as cocaine and crack. Studies have already observed the presence of cocaine in the marine environment, which can have harmful effects on marine organisms. The hypothesis of this work is that the acidification associated with the enrichment of CO<sub>2</sub> in the marine environment will cause a change in the toxicity of the illicit crack drug. The goal is to evaluate sublethal effects of the illicit crack drug combined with acidification by enriching CO<sub>2</sub> in marine ecosystems. The toxicity of cocaine in its non-ionized form (crack) was determined in different pH scenarios (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 and 6.0) related to the increase of CO<sub>2</sub> through the evaluation of sublethal effects in marine organisms from biomarker analyzes. Exposure (GST, GPx and GSH) and effect (AChE and stability of the lysosomal membrane). The analysis of the GST biomarker showed an increase in enzymatic activity at pH 6.5 (0.5, 5 and 50 µg / L crack) and pH 6.0 (5 and 50 µg / L crack), leading to a cellular protection mechanism. In the neurotransmission biomarker AChE there was an inhibition of the enzyme in 48 hours at pH 7.5, 7.0 and 6.5, while at pH 6.0 there was an increase in enzyme production. In 96 hours, there was an inhibition at pH 7.0 and an increase at pH 6.5 and 6.0. The inhibition of AChE activity can result in the loss of biodiversity and the increase in AChE can lead to cell apoptosis. In addition, in the stability of the lysosomal membrane, there was a decrease in the retention of the neutral red dye as the pH decreased and the crack concentrations increased, which could result in compromised immunity and physiology of the organisms, among other things. Stresses related to crack and pH reduction observed in isolation, as well as in combination. It can lead to a decrease in food resources for human beings and a decrease in biodiversity.

**Keywords:** CO<sub>2</sub>. Biomarkers. pH. Acidification. *Perna perna*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema físico-químico do dióxido de carbono em contato com a água do mar.....	2
Figura 2. Estrutura molecular da cocaína e do crack.....	4
Figura 3. Desenho experimental.....	8
Figura 4. Fluxograma da exposição aos biomarcadores.....	8
Figura 5. Sistema de injeção de CO <sub>2</sub> .....	10
Figura 6. Exposição dos organismos em aquários.....	11
Figura 7. Gráfico do tempo de retenção do corante vermelho neutro (NRRT – 48h).....	18
Figura 8. Gráfico do tempo de retenção do corante vermelho neutro (NRRT – 96h).....	19
Figura 9. Gráfico do índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) em 48h de exposição.....	20
Figura 10. Gráfico do índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) em 96h de exposição.....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especiação do sistema de carbonato em diferentes tratamentos.....	14
Tabela 2. Matiz de dados.....	27
Tabela 3. Resultados das análises de PERMANOVA.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	-	Microlitro
$\mu\text{g/L}$	-	Micrograma por litro
$\mu\text{M}$		Micrômetro
$\mu\text{mol}$	-	Micromol
ACh	-	Acetilcolina
AChE	-	Acetilcolinesterase
AO	-	Acidificação oceânica
BP <sup>-3</sup>	-	Benzofenona-3
AT	-	Alcalinidade total
CaCO <sub>3</sub>	-	Carbonato de cálcio
CCS	-	<i>Carbon capture and storage</i>
CDNB	-	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ChE	-	Colinesterase
CIT	-	Carbono inorgânico total
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de carbono
DBF	-	Dealkylase dibenzilfluoresceína
DDT	-	Ditiotreitol
DIC	-	Carbono inorgânico dissolvido
DTNB	-	Reagente de Ellman
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROD	-	Ethoxyresorufin O-desetilase
GPX	-	Glutaciona peroxidase
GR	-	Glutaciona redutase
GSSG	-	Glutaciona oxidada
GSH	-	Glutaciona reduzida
GST	-	Glutaciona S-transferase
H <sup>+</sup>	-	Hidrogênio
HCl	-	Ácido clorídrico
HCO <sup>3-</sup>	-	Bicarbonato
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	Ácido carbônico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Peróxido de hidrogênio
KCl	-	Cloreto de potássio
K <sub>ow</sub>	-	Coeficiente de participação aquosa
LPO	-	Peroxidação lipídica
mg/L	-	Miligramas por litro
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaN <sub>3</sub>	-	Azida de sódio
ng/L	-	Nanogramas por litro

NO <sub>3</sub>	- Nitrato
NRRT	- Tempo de retenção vermelho neutro
NR	- Vermelho neutro
OD	- Oxigênio dissolvido
pCO <sub>2</sub>	- Pressão parcial de dióxido de carbono
pKa	- Constante de dissociação ácida
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SOD	- Superóxido dismutase
SO <sub>4</sub>	- Sulfato
Tris	- Hidroximetil

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Acidificação oceânica	
1.2 Drogas ilícitas como contaminantes emergentes	
1.3 Ensaio ecotoxicológicos	
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	7
2.1 Desenho experimental	
2.2 Sistema de injeção de CO <sub>2</sub>	
2.3 Exposição dos organismos	
2.4 Respostas biológicas	
2.5 Alcalinidade total	
2.6 Análise estatística	
<b>3. RESULTADOS</b> .....	13
3.1 Alcalinidade	
3.2 Respostas biológicas	
3.3 Índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR)	
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	24
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>ANEXOS</b> .....	37

## 1. Introdução

### 1.1 Acidificação oceânica

Os níveis atmosféricos de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) estão aumentando na taxa mais rápida já registrada, causando maior dissolução de  $\text{CO}_2$  no oceano, levando a um processo conhecido como acidificação oceânica (AO) (RAVEN *et al.*, 2005; BERNSTEIN *et al.*, 2008; GATTUSO e HANSSON, 2011). O aumento de  $\text{CO}_2$  deriva de ações antrópicas como a queima de combustíveis fósseis, produção de cimento, agricultura e desmatamento (IPCC 2001), ou de forma natural através de erupções vulcânicas. Quando o  $\text{CO}_2$  entra em contato com a água do mar, ele passa por transformações químicas dando origem ao ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), que rapidamente se dissocia produzindo íons bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e  $\text{H}^+$  e conseqüentemente reduzindo os valores de pH (MILLERO, HUANG e LAFERIERE, 2002). Atualmente, o pH médio da água do mar é de 8,2, podendo variar  $\pm 3$  unidades conforme variações locais, regionais e sazonais (RAVEN *et al.*, 2005). Esse número já é 0,1 unidades de pH menor desde 1750 (RAVEN *et al.*, 2005; BERNSTEIN *et al.*, 2008). Outros estudos mostram que a contínua emissão de  $\text{CO}_2$  pode implicar em uma redução de 0,3 e 0,6 unidades de pH até o final do século XXI (CALDEIRA e WICKETT, 2005; JOOS *et al.*, 2011; PACHAURI *et al.*, 2014).

A redução nos valores de pH pode causar efeitos nos organismos marinhos como estresse fisiológico individual, crescimento, reprodução, sobrevivência e taxa de calcificação reduzida, particularmente em corais e moluscos (GAZEAU *et al.*, 2007; DONEY *et al.*, 2009). Os organismos realizam a calcificação através da absorção de  $\text{CO}_2$  presente no oceano, no qual a reação química favorece a formação de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). No entanto, o aumento de  $\text{CO}_2$  na atmosfera e conseqüente diminuição do pH nos oceanos altera as reações químicas que favorece os organismos marinhos, reduzindo a disponibilidade das moléculas químicas para os organismos e com isso afetando o estágio de vida inicial dos mesmos (Fig.1) (RAIMUNDO e DA SILVA, 2016). De fato, alguns estudos já observaram efeitos significativos em gametas de ostras (*Crassostrea gigas* e *Saccostrea glomerata*), bem como a diminuição da mobilidade do gameta masculino em cenários de acidificação (BARROS *et al.*, 2013; PARKER, ROSS e O'CONNOR, 2009). Em análise de biomarcadores integrados a redução de pH observou uma alta taxa de mortalidade em 15 dias e foi altamente letal para caranguejos, *Portunus pelagicus* (JEEVA PRIYA

et al., 2017).

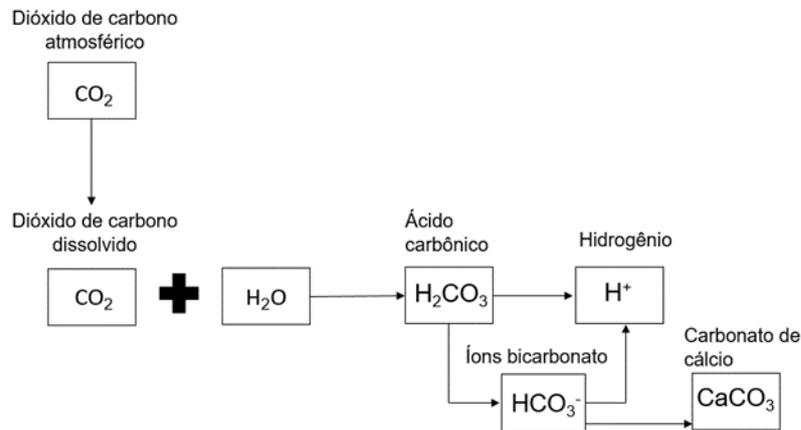


Figura 1. Sistema físico-químico do dióxido de carbono em contato com a água do mar.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos vem analisando possíveis formas de mitigação para reduzir o  $\text{CO}_2$  atmosférico, como o processo de captura e armazenamento de carbono (ou *carbon capture and storage* - CCS) vem sendo estudado nos últimos anos. O CCS tem o potencial de reduzir até 20% as emissões de energia (POWER, 2008). Ele retira, purifica e concentra as emissões de  $\text{CO}_2$  da combustão de combustíveis fósseis em fontes maiores, como usinas de energia (METZ *et al.*, 2005). Existem três métodos para a ocorrência dessa captura de  $\text{CO}_2$ , (i) captura pós-combustão que separa o  $\text{CO}_2$  com o uso de solventes químicos, (ii) captura pré-combustão que retira quimicamente o carbono, deixando apenas o hidrogênio queimar e (iii) combustão de oxi-combustível que queima carvão ou gás no ar desnitrificado, produzindo apenas  $\text{CO}_2$  e água. Depois de deixar a usina, o  $\text{CO}_2$  capturado é pressurizado a 70 bar, formando um líquido que pode ser transportado, onde o fluido é injetado em rochas porosas mais profundas do que 800 metros abaixo da superfície do mar (HOLLOWAY, 2009).

Estudos recentes têm avaliado os possíveis efeitos de vazamento de  $\text{CO}_2$  para o ambiente marinho. Os efeitos do vazamento de  $\text{CO}_2$  dependerão da quantidade de gás  $\text{CO}_2$  liberado nesse ambiente, dos processos de transporte e dispersão, e a capacidade de tamponamento químico do sistema sedimentar ou da água (BLACKFORD *et al.*, 2014). Um determinado estudo demonstrou que um possível vazamento do CCS em larga escala reduziria o pH da água e causaria efeito significativo no sucesso de fertilização e um efeito ainda mais drástico no

desenvolvimento embriolarval dos mexilhões *Perna perna* (SZALAJ *et al.*, 2017).

A interação entre a redução do pH da água do mar e a biodisponibilidade de xenobióticos também vem sendo estudados. No estudo de Cao *et al.* (2019) foi possível observar a partir de análises de biomarcadores, que a exposição a acidificação oceânica e ao cobre levou a um estresse severo para ostras, *Crassostrea gigas*, e a co-exposição (acidificação e cobre) foi a condição mais estressante. Um estudo com antibióticos, composto orgânico, mostrou alteração em diferentes valores de pH, no qual constatou que a forma neutra foi considerada mais biodisponível e, portanto, mais tóxica do que seus metabólitos. Os autores afirmam que os contaminantes orgânicos polares quando presentes na água do mar com alta concentração de CO<sub>2</sub>, apresentarão carga diferente (positiva ou negativa) do que nas atuais condições de pH da água do mar (SIRCAR, 2014).

## 1.2 Drogas ilícitas como contaminantes emergentes

Nos últimos anos o consumo de drogas ilícitas em todo o mundo vem aumentando, sendo comparáveis ao das drogas terapêuticas, levando em conta o número de indivíduos que são usuários de substâncias ilegais como cocaína, maconha, anfetamina, heroína e outros (ZUCCATO e CASTIGLIONI, 2009). As drogas terapêuticas são criadas para serem persistentes, aumentando seu tempo de degradação no ambiente (MULROY, 2001). Em analogia ao observado para drogas terapêuticas, os resíduos de drogas de abuso persistem na urina e nas fezes do consumidor e entram nas redes de esgoto, sendo somente parcialmente removidos na maior parte das estações de tratamento de esgoto (PAL *et al.*, 2013).

Estudos vêm identificando a ocorrência de drogas ilícitas nos ecossistemas aquáticos e apontando seu possível risco ambiental (BINELLI *et al.*, 2012, 2013). No ambiente marinho, em um estudo realizado na costa brasileira (Santos/SP) foi encontrado altas concentrações de cocaína e seus derivados (16,6 - 537 ng/L) (Pereira *et al.*, 2016), sendo as maiores concentrações observadas nesse ambiente. Klosterhaus *et al.* (2013) encontraram 2,4 ng·L<sup>-1</sup> de cocaína nas águas superficiais da Baía de São Francisco e Borova *et al.* (2014) detectaram 2,6 - 7,8 ng·L<sup>-1</sup> de cocaína e 2,2 - 6,6 ng·L<sup>-1</sup> de seu metabólito benzoilecgonina em Santorini na Grécia. Derivado da cocaína, o crack é preparado a partir da extração de uma substância alcaloide da planta *Erythroxylon coca* e da adição de sulfato (SO<sub>4</sub>), nitrato (NO<sub>3</sub>) e ácido clorídrico (HCl), tornando-o um composto polar e hidrossolúvel. Quando misturado com o

bicarbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se transforma em base livre (FLORENCE e ATTWOOD, 2006).

No ambiente marinho, tanto o composto em forma de pó (cocaína) quanto em sua forma sólida (crack) (Fig.2) tornam-se bases livres devido ao pH da água do mar que altera a ionização das bases fracas (FLORENCE e ATTWOOD, 2006). Devido aos valores de pKa (constante de dissociação ácida) para cada composto, torna os produtos farmacêuticos e as drogas ilícitas mais biodisponíveis para a biota marinha (PEREIRA *et al.*, 2016). Em uma área de pH 7,9 a 8,1, como é o caso da Baía de Santos, o valor de pKa da cocaína é de 8,5 e pode ser encontrada na sua forma não-iônica. O pKa influencia no aumento do coeficiente de participação octanol-água ( $\log K_{ow}$ ), para o crack de 0,10 (forma iônica) para 2,30 (forma não-iônica) (PEREIRA *et al.*, 2016). O aumento do valor de  $K_{ow}$  favorece os processos de absorção e bioacumulação nos organismos expostos, podendo aumentar a toxicidade do composto (EPISUITE, 2012; PEREIRA *et al.*, 2016).

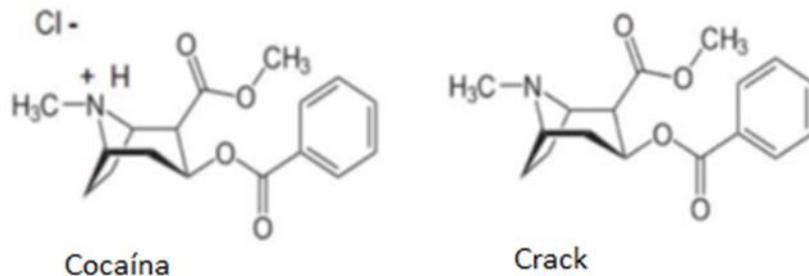


Figura 2. Estrutura molecular da cocaína e do crack.

Fonte: <https://www.socialistamorena.com.br/qual-a-diferenca-entre-crack-e-cocaina-a-classe-social-de-quem-consome/>

Em relação aos efeitos do crack e a acidificação oceânica não se sabe muito ainda. Existem estudos sobre os efeitos de outros compostos orgânicos e a acidificação oceânica. Um estudo observando as ações do fármaco carbamazepina, composto orgânico, junto a acidificação oceânica (pH 7,6) em moluscos bivalves *Mytilus galloprovincialis* demonstrou-se a ativação precoce da resposta imune, processos inflamatórios, apoptose, danos ao DNA, transporte de íons e alterações no metabolismo energético. Sugerindo ameaças potenciais para o estado de saúde de *M. galloprovincialis* (MEZELLANI *et al.*, 2021).

### 1.3 Ensaio ecotoxicológicos

Uma forma de se avaliar os efeitos de xenobióticos e da acidificação oceânica

é através de ensaios ecotoxicológicos que abordam endpoints como os de fertilização, desenvolvimento embriolarval, crescimento ou efeitos subletais por meio de análises dos biomarcadores.

Os biomarcadores são alterações bioquímicas, celulares ou fisiológicas que podem ser avaliadas por meio de análises realizadas nas células, tecidos ou fluidos corporais, sendo estas alterações relacionadas a resposta do organismo a elas (NRC, 1987; DEPLEDGE *et al.*, 1993). São ferramentas eficazes para a detecção dos primeiros sinais de efeitos biológicos (“*early warning*”) na avaliação da qualidade ambiental (CAJARAVILLE *et al.*, 2000) e são utilizados para o monitoramento de diferentes fontes de contaminação costeira (MARANHO *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, estudos ambientais, com o intuito de avaliar o potencial risco ambiental de substâncias xenobióticas, vêm utilizando biomarcadores de exposição e de efeito (CORTEZ *et al.*, 2018; CORTEZ *et al.*, 2019; PIEDADE e NUNES, 2020). Os biomarcadores podem ser classificados em três classes: I) exposição; II) efeito e III) suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são a detecção e medição de respostas causadas por uma substância externa, de seu metabólito ou do produto de uma interação entre um agente xenobiótico e alguma molécula ou célula-alvo dentro do organismo (NRC, 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Dentre os biomarcadores de exposição estão a glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GSH). Já os biomarcadores de efeito detectam alterações bioquímicas e fisiológicas nos tecidos, órgãos ou sistemas de um organismo que possa estar relacionado a exposição a contaminantes (NRC, 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Alguns destes biomarcadores são a acetilcolinesterase (AChE) (GUSSO-CHOUERI *et al.*, 2015) e a estabilidade da membrana lisossômica (KAMIMURA, MARANHO e PEREIRA, 2017). Os biomarcadores de suscetibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos e refletem fatores genéticos ou adquiridos que influenciam na resposta do organismo a uma determinada exposição química (RÜDIGER *et al.*, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993; AKGUR *et al.*, 1999). Entre eles estão, glicose 6-P desidrogenase, glutathione S-transferase (GST) e paroxonase (RÜDIGER *et al.*, 1999).

Existem vários organismos bioindicadores de poluição, são organismos capazes de quantificar e monitorar propriedades dentro do habitat (HEYWOOD e WATSON, 1995), entre eles estão as cracas (REIS, SALGADO e VASCONCELO,

2011; RAINBOW E PHILIPS, 1993), camarões (KLERKS et al., 2007; (PAEZ-OSUNA e RUIZ-FERNFINDEZ, 1993; POURANG E DENNIS, 2005), poliquetas (REISH e GERLINGER, 1997; SAIZ-SALINAS e FRANCES-ZUBILLAGA, 1997), e bivalves (ZORITA et al., 2006; AZARBAD et al., 2010). No caso dos bivalves eles são utilizados como bioindicadores de poluentes persistentes em estudos de monitoramento em áreas costeiras, devido aos seus hábitos sedentários, baixas taxas de transformação metabólica e sua capacidade de concentrar poluentes (MOORE, LIVINGSTONE e WIDDOWS, 1989). No Brasil, o mexilhão bivalve *Perna perna* é amplamente utilizado como sentinela no monitoramento de poluição antrópica em águas costeiras e é importante para os seres humanos como recurso alimentar (ABESSA et al., 2005; CORTEZ et al., 2019, 2018; ORTEGA et al., 2018).

Estudos com compostos orgânicos e a diminuição do pH da água do mar vem ocorrendo para descobrir os efeitos causados por eles na biota marinha em todo o mundo. Alguns desses trabalhos observaram alteração na sensibilidade e no aumento da toxicidade do composto quando analisados em conjunto (acidificação oceânica e xenobióticos) (FREITAS et al., 2016; ALMEIDA et al., 2018). Resultados de um estudo demonstrou que as larvas de uma espécie de ouriço do mar são sensíveis a combinação de pH mais baixos e concentrações de um xenobiótico (DA SILVA SOUZA et al., 2019). A acidificação do meio modifica as propriedades moleculares de uma substância e conseqüentemente sua toxicidade em organismos marinhos (HEUER E GROSELL, 2014). Portanto, a hipótese deste trabalho é que a acidificação do meio modificará a toxicidade da droga ilícita crack.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos subletais da droga ilícita crack combinada com a acidificação do meio pelo enriquecimento de CO<sub>2</sub>. Esta avaliação será realizada partir da análise dos biomarcadores de exposição (GST, GPX e GSH) e de efeito (AChE e estabilidade da membrana lisossomal) em organismos marinhos não-alvo a fim de se compreender a toxicidade da cocaína em sua forma não ionizada (crack) em diferentes cenários de pH.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Desenho experimental

Para avaliar a influência da acidificação na toxicidade da droga crack por meio dos biomarcadores em mexilhões foram analisados 3 fatores: pH (7,5; 7,0; 6,5, 6,0 e o controle pH 8,1); Concentração de crack (0,5; 5; 50 µg/L e um controle de DMSO) e

Tempo de exposição (48h e 96h) (Fig. 3). Os valores de pH utilizados foram baseados no IPCC, segundo o painel o pH diminuirá ainda mais entre 0,3 e 0,5 unidades durante o século XXI, e também foram extrapolados valores mais baixos para observar os possíveis efeitos. Os valores de crack foram determinados através de ensaios preliminares, onde foi encontrado valores de efeito e estão dentro dos valores ambientais encontrados como 12,6 a 537 ng/L<sup>-1</sup> (PEREIRA *et al.*, 2016), 12,18 a 203,6 ng/L<sup>-1</sup> (FONTES *et al.*, 2019), 42,3 ng/L<sup>-1</sup> (FERNÁNDEZ-RUBIO *et al.*, 2019) e 0,8 a 3,10 ng/L<sup>-1</sup> (FEDOROVA *et al.*, 2014). O tempo de exposição dos organismos foram determinados baseados em alguns estudos (MARANHO *et al.*, 2015 e PAROLINI *et al.*, 2013) e de acordo com os estudos prévios, onde não ocorreu diferença significativa em 72 horas em comparação aos outros tempos de estudo (24 e 48 horas). O experimento foi mantido em condições controladas, temperatura da água do mar a 20 ± 2°C, salinidade 35, fotoperíodo 12:12h e foi medido o oxigênio dissolvido no final do experimento, obtendo um valor de 8,0 mg L<sup>-1</sup>. Ao final da exposição foi realizado o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro através da remoção das hemolinhas, em seguida os mexilhões foram dissecados para a posterior análises dos demais biomarcadores (GSH, GST e GPX) (Fig. 4). Os biomarcadores foram escolhidos baseados em suas respostas biológicas. Os biomarcadores GSH, GST e GPx fazem parte do sistema de defesa antioxidante que quando expostos a xenobióticos pode acarretar estresse oxidativo. Já os biomarcadores de AChE e estabilidade da membrana lisossômica avaliam efeitos de neurotoxicidade e citotoxicidade, respectivamente, cada biomarcador causa efeito em um órgão alvo diferente.

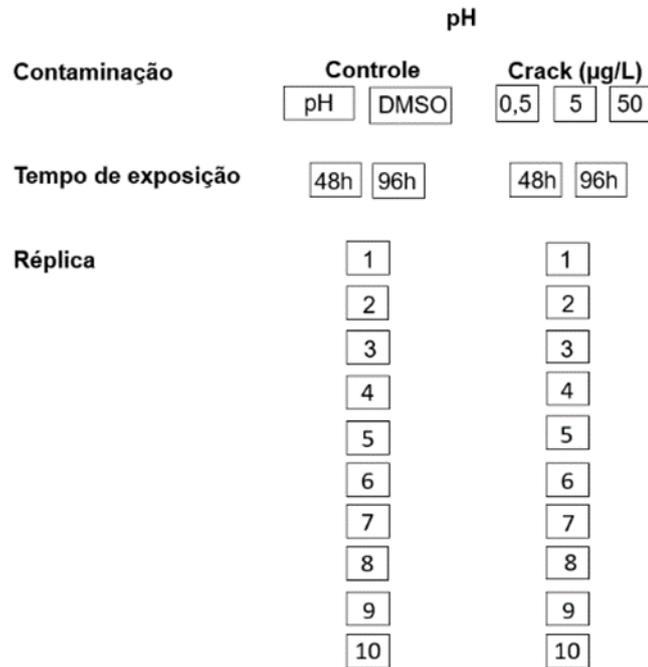


Figura 3. Desenho experimental.  
Fonte: Elaborado pela autora.

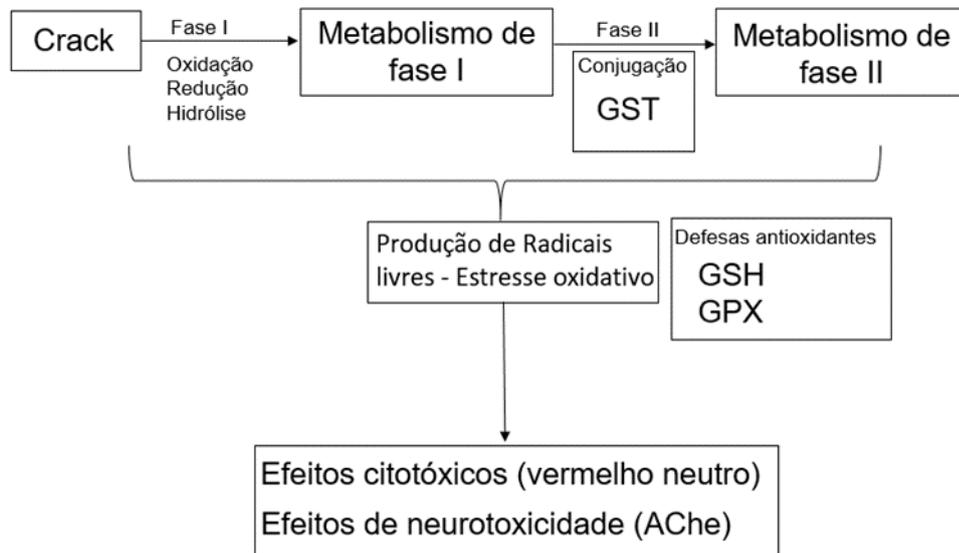


Figura 4. Fluxograma da exposição dos organismos ao crack em respostas das atividades enzimáticas.  
Fonte: Elaborado pela autora.

## 2.2 Sistema de injeção de CO<sub>2</sub>

Para entender como a acidificação dos oceanos pode afetar o ambiente e os organismos marinhos, experimentos em laboratório foram realizados em todo o mundo para avaliar os possíveis efeitos dos íons H<sup>+</sup> (BEARDALL, STOJKOVIC e

LARSEN, 2009; KAPSENBERG *et al.*, 2017; NOGUEIRA *et al.*, 2017; TAYLOR *et al.*, 2015; ZHAN *et al.*, 2017).

Um sistema de injeção de CO<sub>2</sub> (Fig. 5) foi desenvolvido para simular em laboratório o processo de acidificação no ambiente marinho causado pelo enriquecimento de CO<sub>2</sub>, por exemplo, por meio de vazamentos durante o processo de captura e armazenamento de carbono em estruturas subaquáticas estáveis ou ainda simulando o processo de acidificação oceânica. Para esse estudo o sistema de injeção de CO<sub>2</sub> serviu para demonstrar os efeitos da acidificação oceânica derivada do CO<sub>2</sub> atmosférico a partir de uma simulação. O design deste equipamento permitiu o desenvolvimento de ensaios de toxicidade sob condições de acidificação em laboratório. Nesse sentido, os organismos foram expostos a vários valores de pH, para que os possíveis efeitos adversos da acidificação no ecossistema marinho pudessem ser avaliados. O sistema de injeção de CO<sub>2</sub> utilizado para este experimento é uma adaptação do cenário experimental descrito por De Orte *et al.* (2014), processo de patente no: P201200753, Universidade de Cádiz, Faculdade de Ciências Marinhas e Ambientais, Departamento de Química Física (RNM 375).

O sistema de injeção de CO<sub>2</sub> incluiu doze válvulas solenóides que foram controladas individualmente e liberaram o CO<sub>2</sub> no sistema de acordo com cada condição através do sistema de controle da Aqua Medic AT instalado em um computador. Foram utilizados aquários de 20 litros para expor os organismos teste. Cada um dos aquários continha água do mar (salinidade 35) e o pH medido continuamente por meio de um eletrodo de pH conectado a um computador via interface onde o gás era liberado de acordo com a alteração dos valores de pH.

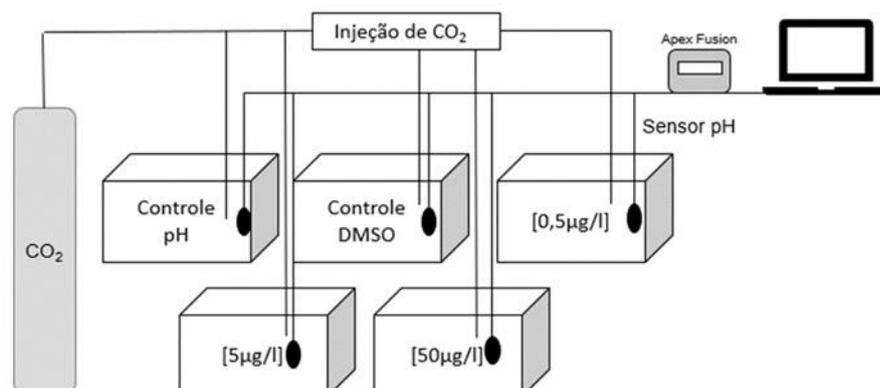


Figura 5. Sistema de injeção de CO<sub>2</sub>.  
Fonte: Elaborado pela autora.

### 2.3 Exposição dos Organismos

Para a exposição dos organismos foram utilizados indivíduos adultos do mexilhão *Perna perna*. Os organismos foram adquiridos de uma fazenda de aquicultura localizada em área de referência no litoral norte do estado de São Paulo (praia de Cocanha, Caraguatatuba, Brasil), local considerado de boa qualidade ambiental. Após a coleta os organismos foram transportados em caixas térmicas ao laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Santa Cecília (Santos/SP). Os organismos então foram aclimatados às condições laboratoriais por 72 horas.

Os mexilhões foram expostos em aquários com capacidade de 20 litros de água do mar (salinidade 35). A água do mar foi previamente coletada na Praia da Enseada, em Guarujá, SP / Brasil, segundo a CETESB (2016) a água está dentro dos critérios de qualidade ambiental, e posteriormente filtrada em malha de 45 µm. Após os organismos inseridos nos aquários, 20 organismos em cada tratamento, o sistema de injeção de CO<sub>2</sub> foi acionado. Foram utilizados valores de pH 8,1 (controle com adição de CO<sub>2</sub>; mantendo um controle no valor de pH); 7,5; 7,0; 6,5 e 6,0, para cada nível de pH continha diferentes concentrações de crack (0,5; 5; 50 µg/L) e um controle de DMSO (utilizado para diluir o crack), bem como um controle de pH, o qual continha somente a variação em íons H<sup>+</sup> na água do mar contendo injeção de CO<sub>2</sub> (Fig. 6).



Figura 6. Exposição dos organismos em aquários.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Em cada uma das concentrações de  $p\text{CO}_2$  e crack foram expostos 20 mexilhões em condições controladas: temperatura da água do mar a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , salinidade 35, e fotoperíodo 12:12h. O oxigênio dissolvido foi medido obtendo o valor de  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Todo o sistema era renovado com a troca total da água do mar a cada 48 horas, sendo renovado apenas uma vez, para manter a qualidade da água, evitando assim contato dos organismos com seus excrementos.

Após 48 e 96h do tempo de exposição, dez mexilhões de cada tratamento de pH e concentrações de crack foram retirados dos aquários e sua hemolinfa extraída para a determinação da estabilidade da membrana lisossômica através do método de tempo de retenção do corante vermelho neutro (NRRT). Em seguida os tecidos de brânquias foram retirados e armazenados em temperatura de  $-80^\circ\text{C}$  para melhor conservação e posterior análise dos biomarcadores GST, GPx, GSH e AChE.

#### 2.4 Respostas Biológicas

A análises da estabilidade da membrana lisossomal foi avaliada através do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro (em inglês NRRT) de acordo com o método descrito por Lowe e Pipe (1994). Foi retirado 0,5 ml de hemolinfa do músculo adutor dos mexilhões com o auxílio de uma seringa hipodérmica contendo 0,5 ml de solução fisiológica. O material coletado foi transferido para tubos eppendorf de 2 ml. Pipetou-se  $40 \mu\text{L}$  de solução de hemolinfa em cada lâmina, previamente tratada com poli-L-lisina, incubando em câmara escura e úmida por 15 minutos. Após esse período,  $40 \mu\text{L}$  de solução vermelho neutro foram adicionados à hemolinfa presente em cada lâmina e incubado por mais 15 minutos. As lâminas foram observadas em um microscópio óptico (400x) a cada 15 minutos e verificado o estresse celular de até 50% ou mais do número total de células na lâmina atingir um extravasamento celular. As células foram examinadas quanto as anormalidades estruturais e tempo de retenção do corante vermelho neutro. As condições foram registradas em uma tabela a cada incremento de tempo. O tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos foi registrado estimando-se a proporção de células exibindo vazamento dos lisossomos no citosol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e na cor dos lisossomos. Alterações no formato da célula podem ocorrer como consequência de um impacto frente a um contaminante.

Para determinação dos biomarcadores bioquímicos, as brânquias de mexilhões foram homogeneizadas com uma solução tampão contendo Tris-HCl (50 mM), EDTA

(1 mM), ditioneitol (DTT; 1 mM), sacarose (50 mM), KCl (150 mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 100 mM). Após a homegeinização as amostras foram centrifugadas a 12000 giros durante 20 min a 4°C e o sobrenadante separado para análise de atividades de glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GSH) e acetilcolinesterase (AChE).

Para quantificar a atividade da GST foi utilizado o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), no qual se utiliza 2 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 2 mM de GSH em meio contendo tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 7,0). O produto da ação enzimática formado, S-2,4-dinitrofenilglutathione, é quantificado pelo aumento de absorvância a 340 nm a 25°C, durante 120 segundos, utilizando-se um  $\epsilon$  de 9,6 mM. Uma unidade (U) de enzima é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de produto/minuto/miligrama de proteína.

A atividade da GPx foi quantificada de acordo com o método proposto por Sies *et al.* (1979). O método é baseado na diminuição da absorvância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. Primeiro foi utilizado o meio de reação composto por tampão fosfato de sódio (0,1 mM; pH 7,0), azida de sódio (NaN<sub>3</sub>; 0,2 mM), NADPH (0,2 mM), GR (1 U/mL) e GSH (2 mM), e após dois minutos de reação foi acrescentado uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + tampão fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,0).

A análise da concentração de tióis não proteicos (glutathione reduzida- GSH) foi realizada através do método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). O método é baseado na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando produto que absorve luz a 415 nm.

A análise da atividade da AChE foi realizada utilizando o método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961), usando acetiltiocolina (ATC) como substrato. Neste procedimento, a tiocolina, produzida por hidrólise enzimática de ATC, reage estequiometricamente com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) para produzir o íon 2-nitro-5-tiobenzoato que absorve 415 nm do comprimento de onda, onde a taxa de aumento na absorção é monitorada.

Foram determinadas concentrações de proteínas totais a partir da espectrofotometria a 595 nm utilizando o método de Bradford 1976, com BSA padrão e utilizada para a padronização dos biomarcadores.

## 2.5 Alcalinidade total

Aa análise da alcalinidade total foi feita a partir dos valores de pH, do controle e concentrações de crack estudados, por meio dos valores de pH e alcalinidade total (AT). Teve como finalidade analisar o carbono inorgânico dissolvido (DIC), carbonatos e suas especiações (bicarbonato ( $\text{HCO}^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), índice de saturação de calcita ( $\Omega$  Cal), índice de saturação de aragonita ( $\Omega$  Arag) e pressão parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ). Os valores de pH e alcalinidade total (AT) foram medidos por um sistema de titulação potenciométrica (Metrohm 794 Basic Titrimo) com um eletrodo de vidro (Metrohm, ref. 6.0210.100), calibrado para a escala total de pH usando ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. O volume de cada amostra foi de 50 mL. As amostras foram analisadas em réplicas. O carbono inorgânico dissolvido (DIC) foi determinado pelos valores experimentais dos valores de AT e pH, considerando as constantes de dissociação descritas por Mehrbach *et al.* (1973) e modificadas por Dickson e Millero (1987) para a escala total de pH. Os valores de AT e pH também foram utilizados para determinar a especiação do sistema de carbonato de água do mar, como o bicarbonato ( $\text{HCO}^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), índice de saturação de calcita ( $\Omega$  Cal), índice de saturação de aragonita ( $\Omega$  Arag) e pressão parcial de dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ) usando o programa CO2SYS (PIERROT, LEWIS e WALLACE, 2006).

## 2.6 Análise estatística

Foi utilizado o teste *t* para os controles de DMSO e pH para todos os biomarcadores estudados, classificada a significância onde  $p < 0,05$ , utilizando o GraphPad Prims 8.

Para a análise dos dados obtidos foi usado a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) de três vias (ANDERSON, GORLEY e CLARKE, 2008) considerando os fatores: tempo (48 e 96 horas), pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0) e contaminação/concentrações de crack (0,5; 5; 50  $\mu\text{g/L}$ ), como fatores fixos. Foi realizado post hoc por pares (pair-wise) quando interações foram detectadas ( $p < 0,05$ ). Os testes de PERMANOVA foram conduzidos em matrizes de distância Euclidiana (considera valor 0). As análises foram feitas utilizando o software estatístico Primer 7.

## 3. Resultados

### 3.1 Alcalinidade total

A partir da análise de alcalinidade total (AT) foram medidos os valores do sistema de carbonato. Os valores médios da especiação do sistema de carbonato para cada concentração de crack em seus respectivos pHs estão demonstrados na Tabela 1. O carbono inorgânico total (CIT) aumentou conforme o valor de pH diminuiu, assim como o  $p\text{CO}_2$ , o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e o  $\text{CO}_2$ . O índice de saturação de calcita ( $\Omega$  calcita), aragonita ( $\Omega$  arag) e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) diminuíram proporcionalmente a diminuição do pH.

Tabela 1: Especiação do sistema de carbonato em diferentes tratamentos.

pH Tratamento	Concentração de crack ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	AT ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	CIT ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	$\text{HCO}_3^-$ ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	$\text{CO}_3^{2-}$ ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	$\text{CO}_2$ ( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ )	$p\text{CO}_2$ ( $\mu\text{atm}$ )	$\Omega$ calcita	$\Omega$ arag
8.1	Controle	1663	1633	1549	42,8	40,8	1346	1	0,7
	0,5	1838	1796	1704	51,8	40,4	1310	1,2	0,8
	5	1951	1976	1867	32,8	75,9	2422	0,8	0,5
	50	1853	1903	1787	25,4	90,7	2935	0,6	0,4
7.5	Controle	1673	1731	1600	27,4	103,4	3394	0,7	0,4
	0,5	1799	1840	1712	33,2	95	3139	0,8	0,5
	5	1849	1927	1789	23,3	115	3721	0,6	0,4
	50	1794	1895	1745	18,9	131	4281	0,5	0,3
7.0	Controle	1683	1829	1651	11,9	166	5442	0,3	0,2
	0,5	1759	1885	1721	14,5	150	4968	0,4	0,2
	5	1747	1879	1711	13,8	154	5020	0,3	0,2
	50	1736	1887	1703	12,4	171	5626	0,3	0,2
6.5	Controle	2428	3913	2409	7,3	1496,6	51288	0,2	0,1
	0,5	2457	3860	2436	8,6	1416	48672	0,2	0,1
	5	2740	3949	2717	9,2	1223	42089	0,2	0,1
	50	2695	4323	2675	7,8	1640	56223	0,2	0,1
6.0	Controle	3172	5997	3167	2,7	2827,1	97133	0,1	0
	0,5	3156	5835	3150	2,8	2682	92375	0,1	0
	5	3732	6019	3722	4,5	2292	79157	0,1	0,1
	50	3653	6759	3647	3,2	3109	106819	0,1	0,1

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2 Respostas biológicas

Os dados obtidos pelas análises dos biomarcadores (GSH, GST, GPx, AChE e NNRT) estão representados na tabela 2 por valores de média e desvio padrão a partir

do tempo de exposição (48 e 96h), concentrações de crack (controle, 0,5, 5 e 50 µg/L) e valores de pH (8.1; 7.5; 7.0; 6.5 e 6.0).

Tabela 2. Matriz dos valores de média e desvio padrão dos resultados das análises de biomarcadores (GSH, GST, GPx, AChE e NNRT) a partir do tempo de exposição (48 e 96h), concentrações de crack (controle, 0,5, 5 e 50 µg/L) e diferentes valores de pH (8.1; 7.5; 7.0; 6.5 e 6.0). Unidades dos biomarcadores: GSH (nmol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), GST (nmol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), GPx (nmol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), AChE (nmol.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>) e NNRT (tempo de retenção).

pH	Concentrações	GSH		GST		GPx		AChE		NNRT	
		48h	96h	48h	96h	48h	96h	48h	96h	48h	96h
8.1	Controle	3,01 (±1,16)	2,71 (±1,19)	10,08 (±4,09)	7,54 (±2,06)	1,14 (±0,36)	1,41 (±0,59)	0,0020 (±0,0006)	0,0012 (±0,0004)	16,50 (±16,51)	27 (±13,78)
	0,5 µg/L	2,75 (±1,16)	5,65 (±3,73)	9,14 (±2,99)	14,79 (±9,11)	1,14 (±0,51)	3,20 (±1,85)	0,0006 (±0,0004)	0,0022 (±0,0011)	28,50 (±17,96)	30 (±13,89)
	5 µg/L	2,03 (±0,88)	4,36 (±3,06)	7,06 (±1,50)	17,03 (±10,58)	0,89 (±0,32)	1,64 (±0,69)	0,0011 (±0,0002)	0,0013 (±0,0005)	15 (±14,14)	22,50 (±14,58)
	50 µg/L	1,69 (±0,74)	2,79 (±1,72)	5,87 (±1,74)	10,35 (±4,61)	0,89 (±0,23)	1,74 (±0,28)	0,0012 (±0,0002)	0,0015 (±0,0004)	31,50 (±21,74)	19,50 (±17,39)
7.5	Controle	1,85 (±0,40)	2,39 (±1,77)	9,98 (±2,23)	9,88 (±8,10)	0,99 (±0,26)	1,42 (±1,14)	0,0013 (±0,0006)	0,0010 (±0,0006)	78 (±33,02)	81 (±30,98)
	0,5 µg/L	1,40 (±0,25)	0,93 (±0,26)	9,69 (±3,33)	5,19 (±1,51)	0,99 (±0,26)	0,84 (±0,22)	0,0012 (±0,0004)	0,0008 (±0,0003)	82,5 (±30,21)	85 (±18,37)
	5 µg/L	1,61 (±0,84)	1,05 (±0,34)	10,65 (±4,46)	6,13 (±1,50)	1,10 (±0,31)	0,88 (±0,32)	0,0010 (±0,0001)	0,0008 (±0,0004)	49,50 (±14,23)	50,63 (±21,12)
	50 µg/L	1,19 (±0,52)	1,29 (±0,38)	6,60 (±2,63)	11,18 (±3,72)	0,83 (±0,38)	0,84 (±0,22)	0,0012 (±0,0004)	0,0011 (±0,0003)	38,33 (±15,21)	61,67 (±20,46)
7.0	Controle	1,26 (±0,48)	1,49 (±0,20)	9,70 (±7,86)	6,23 (±2,19)	0,78 (±0,39)	0,82 (±0,33)	0,0013 (±0,0006)	0,0010 (±0,0002)	76,50 (±23,93)	23,33 (±10,90)
	0,5 µg/L	1,77 (±0,68)	1,89 (±0,71)	4,30 (±1,49)	5,88 (±3,35)	0,95 (±0,41)	0,69 (±0,34)	0,0010 (±0,0004)	0,0008 (±0,0002)	42 (±15,49)	36 (±21,45)
	5 µg/L	1,61 (±0,63)	1,56 (±0,61)	5,00 (±0,88)	6,58 (±1,19)	1,19 (±0,40)	0,76 (±0,31)	0,0015 (±0,0005)	0,0009 (±0,0002)	24 (±12,65)	35,63 (±15,91)
	50 µg/L	1,51 (±0,39)	1,29 (±0,20)	5,52 (±3,10)	8,97 (±2,91)	1,11 (±0,91)	1,11 (±0,91)	0,0012 (±0,0004)	0,0008 (±0,0003)	6 (±12,65)	36,67 (±16,96)
6.5	Controle	1,36 (±0,43)	1,51 (±0,38)	4,03 (±0,81)	6,31 (±2,15)	0,73 (±0,27)	1,14 (±0,39)	0,0010 (±0,0004)	0,0016 (±0,0006)	21 (±7,75)	51,67 (±29,15)
	0,5 µg/L	2,56 (±1,32)	1,45 (±0,38)	11,86 (±2,73)	8,90 (±3,93)	0,92 (±0,45)	0,71 (±0,36)	0,0011 (±0,0004)	0,0011 (±0,0006)	63,75 (±19,23)	36,67 (±21,36)
	5 µg/L	3,40 (±1,45)	2,24 (±1,24)	10,68 (±3,28)	6,90 (±1,80)	1,00 (±0,44)	0,63 (±0,27)	0,0014 (±0,0008)	0,0018 (±0,0011)	23,33 (±23,85)	27 (±15,49)
	50 µg/L	2,29 (±1,10)	1,15 (±0,03)	10,98 (±4,39)	8,28 (±2,61)	0,49 (±0,18)	0,53 (±0,20)	0,0019 (±0,0006)	0,0010 (±0,0005)	36,67 (±26,10)	15 (±12,25)
6.0	Controle	2,07 (±1,06)	1,20 (±0,30)	6,10 (±1,94)	6,29 (±2,02)	1,10 (±0,38)	0,67 (±0,20)	0,0012 (±0,0004)	0,0032 (±0,0011)	49,50 (±17,39)	11,25 (±10,61)
	0,5 µg/L	3,19 (±1,35)	1,69 (±1,31)	9,37 (±3,54)	7,43 (±4,14)	1,34 (±1,01)	0,63 (±0,52)	0,0018 (±0,0006)	0,0044 (±0,0031)	49,50 (±30,86)	21 (±18,97)
	5 µg/L	1,67 (±0,71)	5,14 (±10,34)	7,56 (±1,57)	5,99 (±4,54)	1,09 (±0,54)	1,17 (±0,41)	0,0024 (±0,0013)	0,0035 (±0,0014)	48 (±15,49)	23,33 (±21,36)
	50 µg/L	2,36 (±1,01)	4,32 (±2,49)	6,69 (±3,38)	18,83 (±13,45)	1,16 (±0,48)	6,83 (±2,30)	0,0016 (±0,0009)	0,0025 (±0,0021)	25,50 (±17,39)	21 (±16,12)

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da análise de permanova, observou que para a GSH não houve interações entre os fatores de estudo (tempo de exposição, valores de pH e concentração de crack). Para a GPx não houve interação entre os fatores, mas ocorreu uma diferença entre os dois tempos de exposição independente da contaminação e do pH. Para a GST houve interação entre os fatores pH x Contaminação, enquanto na AChE houve interação entre os fatores Tempo x pH. Já o NRRT foi observado interação entre os fatores os três fatores de estudo (Tempo x pH x Contaminação) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados das análises de PERMANOVA para avaliar diferenças na estrutura multivariada dos biomarcadores de exposição (GSH, GPx e GST) e efeito (AChE e NRRT) para os fatores tempo, pH e contaminação. TE: tempo; pH; CO: contaminação. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ . df: grau de liberdade; MS: média dos quadrados; Pseudo-F: porção do Pseudo-F; p (perm): significância estatística.

GSH				
	df	MS	Pseudo-F	p (perm)
TE	1	3,3884	0,15588	0,795
pH	4	12,02	0,55297	0,786
CO	3	24,274	1,1167	0,359
TE x pH	4	3,4424	0,15837	0,977
TE x CO	3	13,805	0,63512	0,681
pH x CO	12	31,251	1,4377	0,105
TE x pH x CO	12	28,773	1,3237	0,146
Residual	329	21,737		
GPx				
	df	MS	Pseudo-F	p (perm)
<b>TE</b>	<b>1</b>	<b>31,998</b>	<b>4,1094</b>	<b>0,027</b>
pH	4	13,761	1,7673	0,093
CO	3	7,4045	0,95094	0,394
TE x pH	4	12,553	1,6121	0,122
TE x CO	3	3,5825	0,46009	0,766
pH x CO	12	10,903	1,4003	0,135
TE x pH x CO	12	11,573	1,4862	0,084
Residual	326	7,7866		
GST				
	df	MS	Pseudo-F	P (perm)
TE	1	15,76	0,12136	0,802
pH	4	62,774	0,48342	0,775
CO	3	79,678	0,6136	0,673
TE x pH	4	78,672	0,60585	0,751
TE x CO	3	41,747	0,32149	0,86

<b>pH x CO</b>	<b>12</b>	<b>236,23</b>	<b>1,8192</b>	<b>0,02</b>
TE x pH x CO	12	198,13	1,5258	0,067
Residual	333	129,85		

---

AChE				
	df	MS	Pseudo-F	p (perm)
TE	1	9,39E-06	0,89644	0,42
pH	4	4,58E-05	4,3743	0,004
CO	3	1,46E-05	1,389	0,221
<b>TE x pH</b>	<b>4</b>	<b>3,05E-05</b>	<b>2,9097</b>	<b>0,011</b>
TE x CO	3	9,93E-06	0,94773	0,491
pH x CO	12	1,38E-05	1,3131	0,158
TE x pH x CO	12	7,19E-06	0,68593	0,83
Residual	327	1,05E-05		

---

NRRT				
	df	MS	Pseudo-F	p (perm)
TE	1	2120,1	5,3079	0,023
pH	4	19101	47,822	0,001
CO	4	5597,7	14,015	0,001
TE x pH	4	2720	6,8098	0,001
TE x CO	3	989,28	2,4768	0,063
pH x CO	12	1290,8	3,2318	0,001
<b>TE x pH x CO</b>	<b>12</b>	<b>2327,1</b>	<b>5,8262</b>	<b>0,001</b>
Residual	333	399,42		

---

Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise de post hoc foi possível observar que para a GST houve diferença estatística no pH 6.5 nas três concentrações de estudo (0,5, 5 e 50 µg/L) comparado ao controle e no pH 6.0 na concentração de 50 µg/L comparado ao controle, demonstrando um aumento na produção desta enzima (Anexo A). Na enzima de AChE em 48h de exposição houve diferença estatística no pH 7.5 comparado ao controle, demonstra uma inibição da enzima, e no pH 6.0 comparado ao pH 7.5, demonstra uma indução enzimática. Em 96h de exposição houve uma diferença estatística no pH 7.5 comparados aos pHs 7.0, 6.5 e 6.0, no pH 7.0 comparado aos pHs 6.5 e 6.0, e no pH 6.0 comparado ao controle, demonstrando uma indução na produção enzimática (Anexo B).

Para o biomarcador NRRT (vermelho neutro) no tempo de 48h houve diferença significativa no pH 7.5 nas concentrações 5 e 50 µg/L em comparação do controle e da concentração de 0,5 µg/L, no pH 7.0 nas concentrações 0,5, 5 e 50 µg/L em

comparação do controle e entre as concentração de estudo, no pH 6.5 na concentração 0,5 µg/L em comparação do controle de das concentrações de 5 e 50 µg/L e no pH 6.0 nas concentrações 5 e 50 µg/L em comparação ao controle, exceto no pH 6.5 na concentração 0,5 µg/L no tempo de 48 horas (Fig. 7).

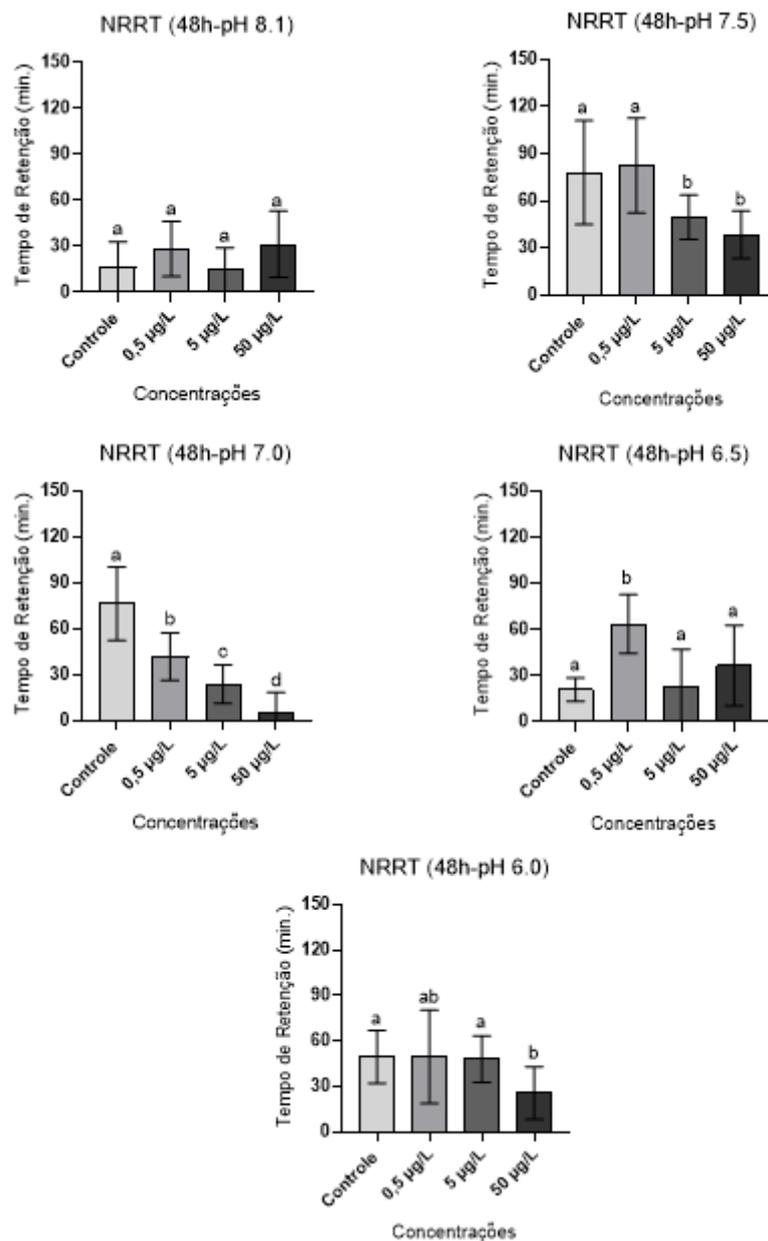


Figura 7. Média e desvio padrão dos resultados do biomarcador de efeito NRRT avaliado após 48h de exposição para os diferentes valores de pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0) e concentrações de crack (0,5; 5 e 50 µg/L). Letras diferentes significam diferenças significativas após o teste de post hoc por pares.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para NRRT (vermelho neutro) no tempo de 96h houve diferença significativa no pH 7.5 nas concentrações 5 e 50 µg/L em comparação ao controle e a

concentração de 0,5 µg/L, no pH 7.0 na concentração 50 µg/L em comparação ao controle e no pH 6.5 nas concentrações 5 e 50 µg/L em comparação ao controle, exceto no pH 7.0 na concentração de 50 µg/L no tempo de 96 horas de exposição (Fig. 8).

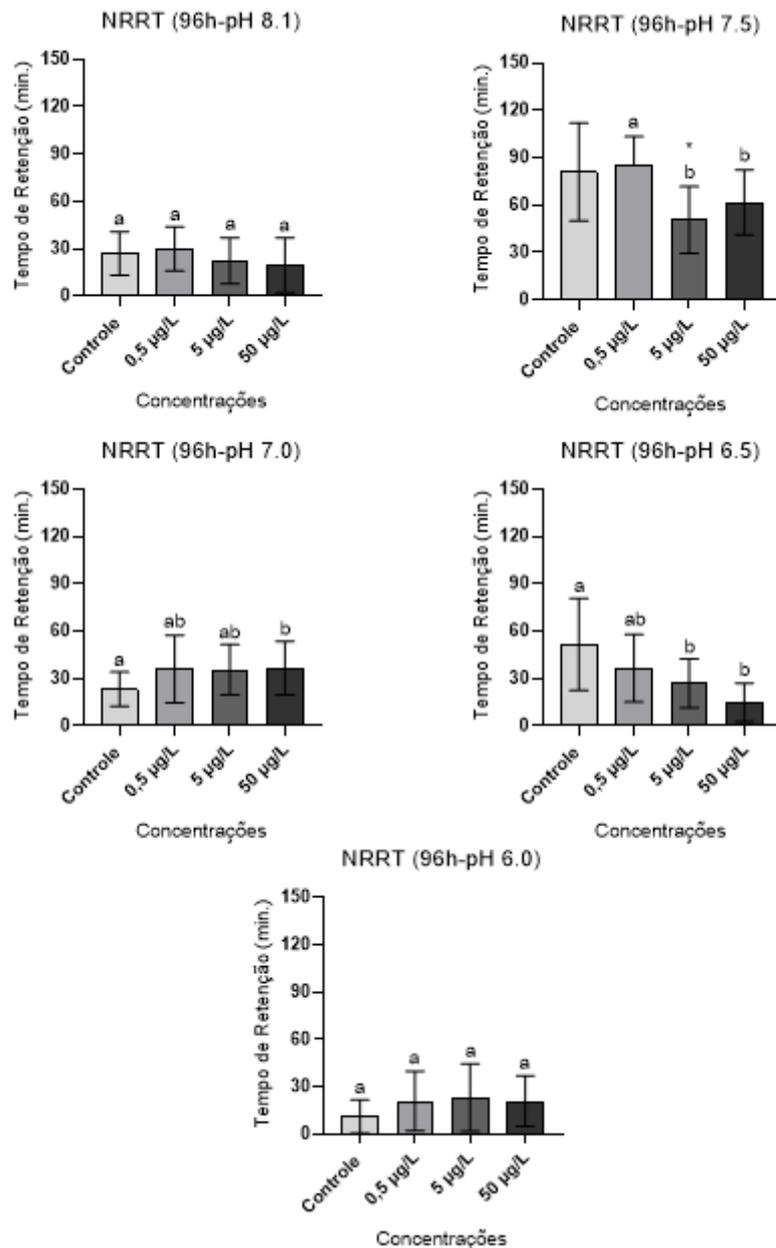


Figura 8. Média e desvio padrão dos resultados do biomarcador de efeito NRRT avaliado após 96h de exposição para diferentes valores de pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0) e concentrações de crack (0,5; 5 e 50 µg/L). (\*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao pH 8.1 e letras diferentes significam diferenças significativas após o teste de post hoc por pares.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3 Índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR)

Foi calculado o índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) para cada valor de pH e tempo de exposição. Para o tempo de 48h de exposição para dos os valores de pH estudados o vermelho neutro (VN) e a AChE demonstraram maior relevância em suas respostas (Fig. 9).



Figura 9. Índice IBR para as brânquias do mexilhão *Perna perna* expostos ao crack nos diferentes valores de pH (8.0, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0), diferentes concentrações de crack 0,5, 5 e 50 µg/L no tempo de 48h de exposição.

Para o tempo de 96h de exposição, o vermelho neutro e a AChE também demonstraram maior relevância, assim como em 48h (Fig. 10).

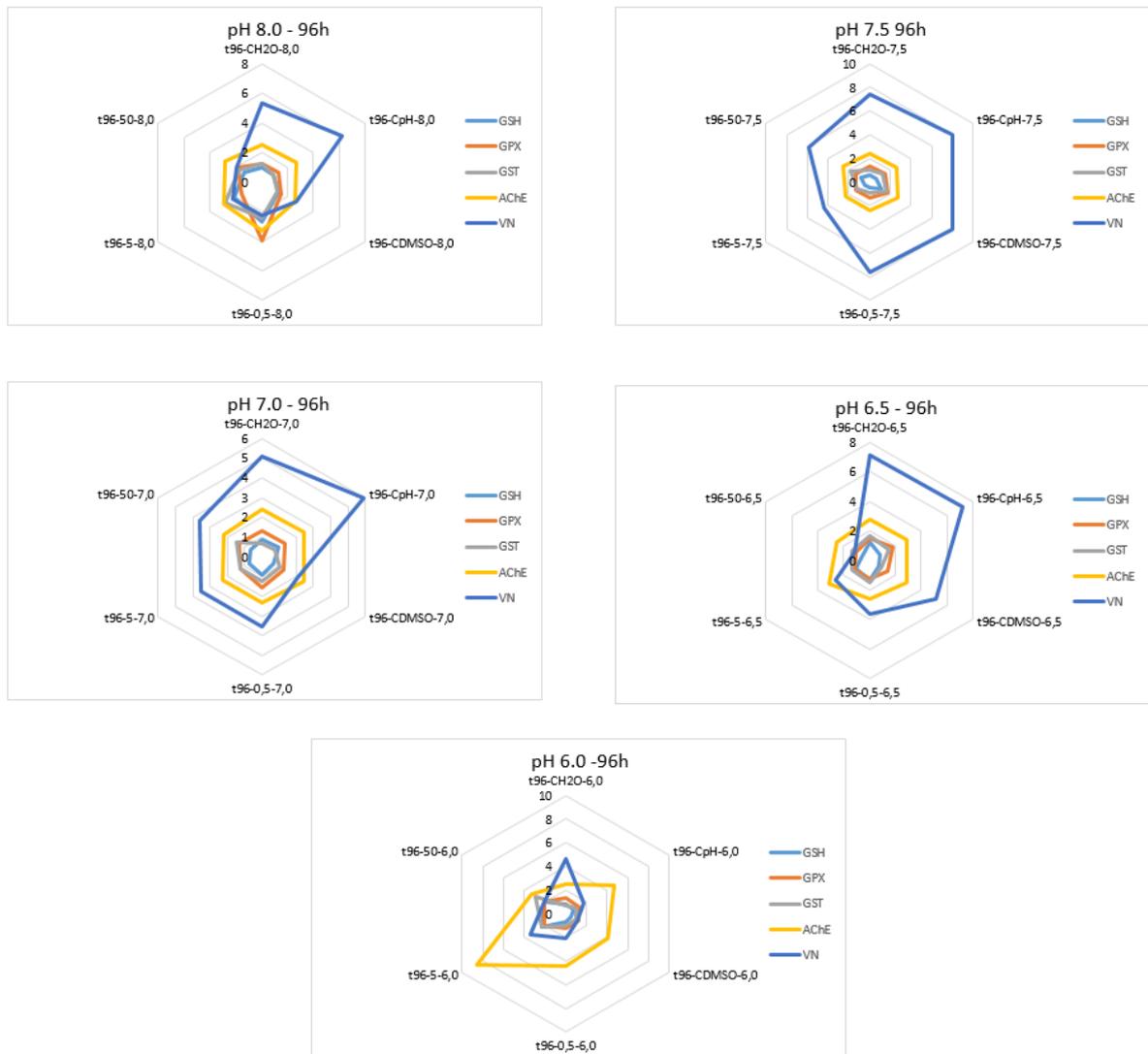


Figura 10. Índice IBR para as brânquias do mexilhão *Perna perna* expostos ao crack nos diferentes valores de pH (8,0, 7,5, 7,0, 6,5 e 6,0), diferentes concentrações de crack 0,5, 5 e 50 µg/L no tempo de 96h de exposição.

#### 4. Discussão

O presente estudo avaliou, pela primeira vez, o efeito de uma droga ilícita em uma espécie comercial de moluscos (*P. perna*) sob condições reais e previstas relacionadas às mudanças climáticas, ou seja, diminuição do pH da água do mar.

Igualmente ao nosso estudo, alguns estudos mostraram que a cocaína causa danos nas estruturas e nas funções dos órgãos de organismos (mexilhões, ratos, peixes, entre outros) devido a mecanismos de diferentes ações (MARANHO *et al.*, 2017; MORETTI *et al.*, 2016; PAROLINI *et al.*, 2017). Alguns efeitos prejudiciais são

causados pela super estimulação do sistema adrenérgico, enquanto a maioria dos efeitos tóxicos diretos são promovidos pelo estresse oxidativo e disfunção mitocondrial que ocorre durante a metabolização da droga (RIEZZO *et al.*, 2012). Além disso, vale ressaltar que a toxicidade da cocaína envolve também seus subprodutos como o crack, sua bioatividade induz efeitos fisiológicos em organismos marinhos (Maranho *et al.*, 2017; Ortega *et al.*, 2018), terrestres e aquáticos não-alvo (PAROLINI *et al.*, 2013, 2017; GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015). Da Silva Souza *et al.* (2019) observaram que os cenários acidificados provocaram o aumento da toxicidade do crack para a fertilização e o desenvolvimento embriolarval de uma espécie de ouriço do mar (*Echinometra lucunter*). No entanto, o ensaio de desenvolvimento embriolarval demonstrou maior sensibilidade do que o ensaio de fertilização, o que indica uma possível disfunção mitocondrial.

No presente foi observado o aumento do carbono inorgânico total (CIT) em relação a diminuição do pH, no qual o aumento pode estar relacionado as alterações sofridas por meio de processos biológicos (MCNEIL e SASSE, 2016). O CIT está ligado com o equilíbrio químico do sistema carbonato, conseqüentemente a alteração do valor do CIT promove uma mudança na  $p\text{CO}_2$  (MCNEIL e SASSE, 2016) e o aumento da  $p\text{CO}_2$  afeta a química do carbonato (KROEKER *et al.*, 2013; STILLMAN E PAGANINI, 2015). Também foi observado a diminuição da saturação de calcita, aragonita e carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) conforme a diminuição dos valores de pH estudados (pH 8,1; 7,5; 7,0; 6,5 e 6,0). Essa diminuição representa uma grande ameaça para os organismos marinhos, principalmente os formadores de conchas e calcificadores (HENDRIKS *et al.*, 2010), pois a composição de uma concha de bivalve adulto consiste em calcita, aragonita ou ambas, com tudo, todas as conchas de larvas de bivalves contêm aragonita (WEISS *et al.*, 2002), a forma mais solúvel de  $\text{CaCO}_3$  (DA SILVA SOUZA, 2019). A diminuição do pH da água do mar leva a uma água mais ácida. Assim, a acidez da água do mar causa uma diminuição na calcificação (GAZEAU *et al.*, 2007), afetando todo o ciclo de vida de organismos calcificadores.

A enzima glutationa S-transferase (GST) faz parte da superfamília das enzimas de biotransformação tendo como funções: conjugação de compostos endógenos hidrossolúveis em substratos lipossolúveis e catalisa a conjugação de GSH (cofator da GST) tornando os produtos das reações menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (ROSSINI *et al.*, 2002; LAM *et al.*, 1994), também tem papel fundamental na defesa contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos de DNA e de

lipídeos (VAN DEER OOST *et al.*, 2003). Este estudo observou uma indução do nível da enzima GST no pH 6.5 nas concentrações 0,5, 5 e 50 µg/L e no pH 6.0 nas concentrações 5 e 50 µg/L. Lopes *et al.* (2020) observaram que a atividade enzimática da GST foi induzida frente a associação de um composto orgânico com a diminuição do pH (7.6) em brânquias de uma espécie de molusco bivalve, *Amarilladesma mactroides*. Essa indução está relacionada a uma melhor detoxificação dos xenobióticos através da formação de um complexo com a GSH (EL-SHENAWY, 2010) e na proteção celular contra substâncias tóxicas pró-oxidantes (OTITOJU e ONWURAH, 2007). Essa indução pode ser considerada uma adaptação fisiológica a contaminação orgânica (MARANHO *et al.*, 2012).

Segundo Da silva souza *et al.* (2019), que analisou os biomarcadores de peroxidação lipídica (LPO) e danos em DNA em brânquias de mexilhões *P. perna* expostos a acidificação oceânica e diferentes concentrações de crack/cocaína (CC), observou em 48h de exposição uma inibição da peroxidação lipídica no pH 7.0 nas concentrações de 0,5, 5 e 50µg/L de CC em comparação ao controle e no pH 6.0 na concentração de 5 µg/L de CC observou-se uma indução em comparação ao controle. Já em 96h de exposição foi observado uma inibição de LPO no pH 8.0 na concentração de 0,5 µg/L e no pH 6.0 na concentração de 5 µg/L de CC em comparação ao controle. Foi observado para danos em DNA em 48h de exposição uma indução no pH 7.5 na concentração de 0,5 µg/L de CC. A ocorrência de LPO se dá através do contido dos radicais livres (espécies reativas de oxigênio), em grandes quantidades, com os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (LIMA e ABDALLA, 2001). O processo de LPO pode acarretar a destruição da estrutura das membranas celulares, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e até mesmo levar a morte celular (BENZIE, 1996). Os radicais livres também, em grande quantidade, levam ao dano em DNA. Esse dano causa fragmentações simples ou duplas do DNA, necrose e apoptose (VAN DER OOST, BEYER, e VERMEULEN, 2003; COLLINS *et al.*, 1995).

A acetilcolinesterase está presente na classe de enzimas colinesterase (ChE), sendo uma enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (BRUTON *et al.*, 2006; COLOVIC *et al.*, 2013) responsável por transmitir impulsos nervosos entre os neurônios (STENESH, 1998). Alguns xenobióticos são capazes de inibirem a produção de AChE, fazendo com que haja uma contínua produção de ACh, com estímulo nervoso contínuo nas junções neuromusculares (INOUYE e OLIVEIRA, 2004). No tempo de 48 horas deste estudo foi possível observar efeitos de inibição

na AChE nos pHs 7.5, 7.0 e 6.5. No estudo de Franzellitti *et al.* (2014) que analisou os efeitos de fluoxetina, um composto orgânico, em uma espécie de mexilhão marinho (*Mytilus galloprovincialis*) e observou a inibição da enzima AChE. Um outro estudo, observou a inibição da AChE quando os organismos testes, espécies de bivalves (*Donax cuneatus*), foram expostos a acidificação oceânica (Priya *et al.*, 2016). Essa inibição da AChE em moluscos bivalves pode promover alterações no controle do fechamento das válvulas, nos movimentos musculares e no batimento ciliar, e conseqüentemente em suas funções fisiológicas como fuga, locomoção, taxa de filtração e alimentação (VIARENGO *et al.*, 2007). Portanto, estas ações resultantes da inibição da atividade de AChE podem resultar na perda da biodiversidade, bem como a disponibilidade de espécies comerciais, e conseqüentemente a um desequilíbrio no ecossistema.

Já no pH 6.0 do mesmo tempo foi possível observar uma indução na atividade desta enzima. Já em 96 horas de exposição, foi observado que no pH 7.0 houve uma inibição e nos pHs 6.5 e 6.0 houve uma indução da AChE. No estudo de Costa *et al.* (2020) que analisou o fármaco triclosan em uma espécie de bivalve, foi observado uma indução da atividade da enzima AChE no pH mais baixo (pH 7.7) e na temperatura mais alta (21°C). Um outro estudou demonstrou também uma indução da atividade da enzima AChE, em um gastrópode (*Gibbula umbilicalis*) sob a ação do ácido salicílico (SA; 5 µg/L) em pH 7.6 comparado ao pH controle (pH 8.2) (DIONÍSIO *et al.*, 2020). Esta indução na atividade da enzima AChE pode estar associada à apoptose celular, provavelmente porque a ruptura da membrana celular promove a liberação de ChE (ZHANG *et al.*, 2002).

As repostas do tempo de retenção do corante vermelho neutro demonstraram uma diminuição do tempo de retenção do corante na membrana lisossômica havendo algumas exceções, nesses casos foi observado apenas os efeitos da redução do pH e não da associação da redução do pH com a presença do crack. Segundo Ortega (2018), os mexilhões são considerados saudáveis quando o tempo de retenção do corante for  $\geq 60$  minutos, estressados, porém compensando quando for  $< 60$  e  $\geq 30$  minutos e severamente estressados quando for  $\leq 30$  minutos. No presente estudo houve uma redução no tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos em 48 horas de exposição, indicando que os mexilhões se mostraram estressados, porém compensando e severamente estressados; em 96 horas, eles estavam severamente estressados. No caso do pH 6.5 na concentração 0,5 µg/L no tempo de

48 horas o tempo de retenção do corante vermelho neutro indicou que os organismos estavam saudáveis ( $\geq 60$  minutos) e no pH 7.0 na concentração de 50  $\mu\text{g/L}$  no tempo de 96 horas, eles estavam estressados, porém compensando ( $< 60$  e  $\geq 30$  minutos).

Os resultados que demonstram a inibição do tempo de retenção do corante podem indicar um aumento da permeabilidade da membrana aos substratos, interrupção lisossomal normal, autofagia, entre outros (BAYNE *et al.*, 1985).

Alguns estudos já reportaram a inibição do tempo de retenção do corante vermelho neutro em mexilhões *Perna perna* quando expostos a droga crack (Maranho *et al.*, 2017; Ortega, 2018). No estudo de Beesley *et al.* (2008), a inibição na retenção do corante vermelho neutro em lisossomos de mexilhões (*Mytilus edulis*) foi devido a redução dos pHs do meio.

Os resultados obtidos no ensaio de estabilidade da membrana lisossômica, onde as células observadas foram estressadas quando expostas a acidificação oceânica e as concentrações de crack leva aos primeiros sinais de efeito, peroxidação lipídica e danos em DNA. Os lisossomos são alvos preferenciais dessas moléculas tóxicas e têm como função a alocação de xenobióticos (LOWE, MOORE e EVANS, 1992) e auxiliam na reparação os danos celulares (BEESLEY *et al.*, 2008). O ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro é baseado no princípio de que apenas os lisossomos em células saudáveis podem absorver e reter o corante vermelho neutro. O impacto de xenobióticos causam danos na membrana e diminuem o tempo de retenção induzindo o vazamento de componentes lisossomais (DAILIANIS *et al.*, 2003). As alterações nos lisossomos podem resultar no comprometimento tanto da imunidade quanto da fisiologia dos organismos (GRUNDY *et al.*, 1996), bem como reduzir o crescimento e o potencial reprodutivo das populações a longo prazo.

O ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro fornece alertas antecipados de riscos ecológicos para o ambiente (CORTEZ *et al.*, 2012), tornando-se uma ferramenta importante para detectar os primeiros sinais de efeitos (“early warning”). Os biomarcadores, assim como o ensaio da estabilidade da membrana lisossômica, podem ser utilizados para embasar a avaliação de risco ambiental e para criar medidas protetivas para prevenir efeitos nos níveis superiores (população e comunidade) (PUSCEDDU, 2016).

Os resultados obtidos no IBR corroboram com os resultados obtidos na PERMANOVA, demonstrando uma maior atividade do vermelho neutro e da AChE, seguido da GST, GPX e GSH. O IBR também revelou que no pH 6.0 na concentração

de 5 µg/L no tempo de 96h houve maior efeito para os organismos.

## **5. Conclusão**

O presente estudo demonstrou respostas subletais referente às enzimas de defesa celular, neurotransmissão e estabilidade da membrana lisossomal frente a mudanças de pH e exposição ao crack em brânquias de mexilhões *P. perna*. Foram observados estresses relacionados ao crack e redução de pH isoladamente, bem como em combinação. De fato, a inserção de substâncias ilícitas, como é o caso do crack, podem alterar as funções celulares e enzimáticas de organismos aquáticos marinhos. No entanto, as mudanças climáticas são uma realidade não muito distante que dever ser considerada, principalmente em relação a acidificação isolada ou associada a substâncias xenobióticas presentes no ambiente. Para além disso, os estressores ambientais isolados ou associados podem interferir na saúde de organismos comercialmente relevantes. Portanto, pode ocorrer uma diminuição do número de organismos e interferir na qualidade dos mesmos como recurso alimentar para os seres humanos, bem como na perda de biodiversidade e com isso contribuir para um desequilíbrio do ecossistema.

## Trabalho submetido

**Ecotoxicology and Environmental Safety**  
 Antioxidant defenses and neurotoxic effect of crack-cocaine in marine mussels  
 under oceanic acidification scenarios  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research paper
Section/Category:	Ecotoxicology
Keywords:	CO2; Biomarkers; pH; Acidification; <del>Perna perna</del> ; marine pollution
Corresponding Author:	Camilo Dias Seabra Pereira, Ph.D Universidade Federal de São Paulo Santos, BRAZIL
First Author:	Julia Luzzi
Order of Authors:	Julia Luzzi Lorena Souza Paloma Gusso-Choueri Mariana Ferraz Leticia Lopes Danielle Araujo Caio Nobre Mayana Fontes Denis Abessa Tomas Del Valls Camilo Dias Seabra Pereira, Ph.D

Abstract:	<p>Since 1750, the pH of seawater has been decreasing, and this decrease is called ocean acidification. According to scientific literature, the main cause of oceanic acidification is the increase in carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), a greenhouse gas, resulting from the burning of fossil fuels. In addition to this problem, in coastal areas there is an increase in the discharge of domestic sewage containing illicit drugs, such as cocaine and crack. Studies have already observed the presence of cocaine in the marine environment, which can have deleterious effects on marine organisms. The hypothesis of this work is that the acidification associated with the enrichment of CO<sub>2</sub> in the marine environment will cause a change in the toxicity of the illicit crack drug. The objective is to evaluate sublethal effects of the illicit crack drug combined with acidification by enriching CO<sub>2</sub> in marine ecosystems. The toxicity of cocaine in its nonionized form (crack) was determined in different pH scenarios (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 and 6.0) related to the increase of CO<sub>2</sub> through the evaluation of sublethal effects in marine organisms from biomarker analyzes. Exposure (GST, GPx and GSH) and effect (AChE and stability of the lysosomal membrane). The analysis of the GST biomarker showed an increase in enzymatic activity at pH 6.5 (0.5, 5 and 50 µg / L crack) and pH 6.0 (5 and 50 µg / L crack), leading to a cellular protection mechanism. In the neurotransmission biomarker AChE there was an inhibition of the enzyme in 48 hours at pH 7.5, 7.0 and 6.5, whereas at pH 6.0 there was an increase in enzyme production. In 96 hours, there was an inhibition at pH 7.0 and an increase at pH 6.5 and 6.0. The inhibition of AChE activity can result in the loss of biodiversity and the increase in AChE can lead to cell apoptosis. In addition, in the stability of the lysosomal membrane, there was a decrease in the retention of the neutral red dye as the pH decreased and the crack concentrations increased, which could result in compromised immunity and physiology of the organisms, among other things. Stresses related to crack and pH reduction observed in isolation, as well as in combination. It can lead to a decrease in food resources for human beings and a decrease in biodiversity.</p>
-----------	--

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

Suggested Reviewers:	<p>Julia Blasco julian.blasco@csic.es</p> <p>Laura Martin laura.martin@uca.es</p> <p>Afonso Bainy Afonso.bainy@ufsc.br</p> <p>Bruno Nunes nunes.b@ua.pt</p> <p>Fabiana Lo Nostro f.lonostro@gmail.com</p>
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. D. S., ZARONI, L. P., SOUSA, E. C. P. M. D., GASPARRO, M. R., PEREIRA, C. D. S., RACHID, B. R. D. F., KING, R. S. Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48(2), 217-225. 2005.
- AKGUR, S. A., OZTURK, P. E. L. İ. N., SOZMEN, E. Y., DELEN, Y., TANYALCIN, T., EGE, B. Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in humans exposed to organophosphorous compounds. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, 58(8), 469-474. 1999.
- ALMEIDA, Â., FREITAS, R., CALISTO, V., ESTEVES, V. I., SCHNEIDER, R. J., SOARES, A. M., BARATA, C. Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam *Ruditapes philippinarum*. **Environmental Pollution**, 235, 857-868. 2018.
- ALMEIDA, E. A., BAINY, A. C. D., DAFRE, A. L., GOMES, O. F., MEDEIROS, M. H., DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 318(1), 21-30. 2005.
- ANDERSON, M., GORLEY, R., CLARKE, K. P. For PRIMER: guide to software and statistical methods. **Primer-e, Plymouth, UK**. 2008.
- ARSEGO, I. B. Sorção dos herbicidas diuron e hexazinone em solos de texturas contrastantes. **Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo**. 2009.
- AZARBAD, H., KHOI, A. J., MIRVAGHEFI, A., DANEKAR, A., SHAPOORI, M. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals by rock oyster *Saccostrea cucullata* in the Persian Gulf. **International aquatic research**, 2(1), 61-69. 2010.
- BARROS, P., SOBRAL, P., RANGE, P., CHÍCHARO, L., MATIAS, D. Effects of seawater acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 440, 200-206. 2013.
- BEARDALL, J., STOJKOVIC, S., LARSEN, S. Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. **Plant Ecology & Diversity**, 2(2), 191-205. 2009.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International journal of food sciences and nutrition**, 47(3), 233-261. 1996.
- BEESELEY, A., LOWE, D. M., PASCOE, C. K., WIDDICOMBE, S. Effects of CO<sub>2</sub> induced seawater acidification on the health of *Mytilus edulis*. **Climate Research**, 37(2-3), 215-225. 2008.

- BERNSTEIN, L., BOSCH, P., CANZIANI, O., CHEN, Z., CHRIST, R., DAVIDSON, O., KUNDZEWICZ, Z. W. Climate change 2007: Synthesis report: An assessment of the intergovernmental panel on climate change. **IPCC**. 2008.
- BINELLI, A., PEDRIALI, A., RIVA, C., PAROLINI, M. Illicit drugs as new environmental pollutants: cytogenotoxic effects of cocaine on the biological model *Dreissena polymorpha*. **Chemosphere**, 86(9), 906-911. 2012.
- BINELLI, A., MARISA, I., FEDOROVA, M., HOFFMANN, R., RIVA, C. First evidence of protein profile alteration due to the main cocaine metabolite (benzoylecgonine) in a freshwater biological model. **Aquatic toxicology**, 140, 268-278. 2013.
- BLACKFORD, J., STAHL, H., BULL, J. M., BERGÈS, B. J., CEVATOGLU, M., LICHTSCHLAG, A., NAYLOR, M. Detection and impacts of leakage from subseafloor deep geological carbon dioxide storage. **Nature climate change**, 4(11), 1011-1016. 2014.
- BOROVA, V. L., MARAGOU, N. C., GAGO-FERRERO, P., PISTOS, C., & THOMAIDIS, N. S. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 406(17), 4273-4285. 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254. 1976.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, 27(9-10), 951-965. 1999.
- CALDEIRA, K., WICKETT, M. E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, 110(C9). 2005.
- CAJARAVILLE, M. P., BEBIANNO, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, 247(2-3), 295-311. 2000.
- CAO, R., ZHANG, T., LI, X., ZHAO, Y., WANG, Q., YANG, D., ZHAO, J. Seawater acidification increases copper toxicity: A multi-biomarker approach with a key marine invertebrate, the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. **Aquatic Toxicology**, 210, 167-178. 2019.
- CARLETTI, E., SULPIZIO, M., BUCCIARELLI, T., DEL BOCCIO, P., FEDERICI, L., DI ILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic toxicology**, 90(1), 48-57. 2008.
- CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - **Qualidade das praias litorâneas no Estado de São Paulo**, 2016.

CLASSICS ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, 7, 88-95. 1961.

EPISUITE - Estimation Program Interface. **Environmental Protection Agency. Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington**. 2012.

COLLINS, A. R., AI-GUO, M., DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, 336(1), 69-77. 1995.

COLOVIC, M. B., KRSTIC, D. Z., LAZAREVIC-PASTI, T. D., BONDZIC, A. M., VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, 11(3), 315-335. 2013.

CORTEZ, F. S., PEREIRA, C. D. S., SANTOS, A. R., CESAR, A., CHOUERI, R. B., DE ASSIS MARTINI, G., BOHRER-MOREL, M. B. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Environmental pollution**, 168, 145-150. 2012.

CORTEZ, F. S., DA SILVA SOUZA, L., GUIMARÃES, L. L., ALMEIDA, J. E., PUSCEDDU, F. H., MARANHO, L. A., PEREIRA, C. D. S. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). **Science of the Total Environment**, 637, 1363-1371. 2018.

CORTEZ, F. S., DA SILVA SOUZA, L., GUIMARÃES, L. L., PUSCEDDU, F. H., MARANHO, L. A., FONTES, M. K., PEREIRA, C. D. S. Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel *Perna perna*. **Marine pollution bulletin**, 141, 366-372. 2019.

COSTA, S., COPPOLA, F., PRETTI, C., INTORRE, L., MEUCCI, V., SOARES, A. M., FREITAS, R. Biochemical and physiological responses of two clam species to Triclosan combined with climate change scenario. **Science of the Total Environment**, 724, 138143. 2020.

DA SILVA SOUZA, L., PUSCEDDU, F. H., CORTEZ, F. S., DE ORTE, M. R., SEABRA, A. A., CESAR, A., PEREIRA, C. D. S. Harmful effects of cocaine byproduct in the reproduction of sea urchin in different ocean acidification scenarios. **Chemosphere**, 236, 124284. 2019.

DA SILVA SOUZA, L. Adverse effects of crack/cocaine to marine organisms affected by acidification conditions. 2019.

DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G. P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M., DIMITRIADIS, V. K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, 56(4), 443-470. 2003.

DEPLEDGE, M. H., AMARAL-MENDES, J. J., DANIEL, B. R. S. H., HALBROOK, R. S., KLOEPFER-SAMS, P., MOORE, M. N., PEAKALL, D. B. The conceptual basis of the biomarker approach. In **Biomarkers** (pp. 15-29). Springer, Berlin, Heidelberg. 1993.

DICKSON, A. G., MILLERO, F. J. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, 34(10), 1733-1743. 1987.

DIONÍSIO, R., DANIEL, D., ARENAS, F., CAMPOS, J. C., COSTA, P. C., NUNES, B., CORREIA, A. T. Effects of pH on salicylic acid toxicity in terms of biomarkers determined in the marine gastropod *Gibbula umbilicalis*. **Marine Environmental Research**, 104995. 2020.

DONEY, S. C., FABRY, V. J., FEELY, R. A., KLEYPAS, J. A. Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem. **Annual Review of Marine Science**, vol. 1:169-192. 2009.

FEDOROVA, G., RANDAK, T., GOLOVKO, O., KODES, V., GRABICOVA, K., GRABIC, R. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. **Science of the total environment**, 487, 681-687. 2014.

FERNÁNDEZ-RUBIO, J., RODRÍGUEZ-GIL, J. L., POSTIGO, C., MASTROIANNI, N., DE ALDA, M. L., BARCELÓ, D., VALCÁRCEL, Y. Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment. **Chemosphere**, 224, 379-389. 2019.

FLORENCE, A. T., ATTWOOD, D. Physicochemical principles of pharmacy: In manufacture, formulation, and clinical use. **Pharmaceutical press**. 2015.

FRANZELLITTI, S., BURATTI, S., CAPOLUPO, M., DU, B., HADDAD, S. P., CHAMBLISS, C. K., FABRI, E. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. **Aquatic Toxicology**, 151, 14-26. 2014.

FREITAS, R., ALMEIDA, Â., CALISTO, V., VELEZ, C., MOREIRA, A., SCHNEIDER, R. J., SOARES, A. M. The impacts of pharmaceutical drugs under ocean acidification: new data on single and combined long-term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. **Science of the Total Environment**, 541, 977-985. 2016.

GARCÍA-CAMBERO, J. P., GARCÍA-CORTÉS, H., VALCÁRCEL, Y., CATALÁ, M. Environmental concentrations of the cocaine metabolite benzoylecgonine induced sublethal toxicity in the development of plants but not in a zebrafish embryo-larval model. **Journal of hazardous materials**, 300, 866-872. 2015.

GATTUSO, J. P., & HANSSON, L. (Eds.). Ocean acidification. **Oxford University Press**. 2011.

GAZEAU, F., QUIBLIER, C., JANSEN, J. M., GATTUSO, J. P., MIDDELBURG, J. J.,

HEIP, C. H. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification. **Geophysical research letters**, 34(7). 2007.

HEYWOOD, V. H., WATSON, R. T. Global biodiversity assessment (Vol. 1140). **Cambridge: Cambridge university press**. 1995.

GUSSO-CHOUERI, P. K., CHOUERI, R. B., DE ARAÚJO, G. S., CRUZ, A. C. F., STREMELE, T., CAMPOS, S., RIBEIRO, C. A. O. Assessing pollution in marine protected areas: the role of a multi-biomarker and multi-organ approach. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(22), 18047-18065. 2015.

HENDRIKS, I. E., DUARTE, C. M., ÁLVAREZ, M. Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: a meta-analysis. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 86(2), 157-164. 2010.

HEUER, R. M., GROSELL, M. Physiological impacts of elevated carbon dioxide and ocean acidification on fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 307(9), R1061-R1084. 2014.

HOLLOWAY, S. Storage capacity and containment issues for carbon dioxide capture and geological storage on the UK continental shelf. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part A: Journal of Power and Energy**, 223(3), 239-248. 2009.

HU, M., LI, L., SUI, Y., LI, J., WANG, Y., LU, W., DUPONT, S. Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. **Fish & shellfish immunology**, 46(2), 573-583. 2015.

HUBER, P. C., ALMEIDA, W. P., FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, 31(5), 1170-1179. 2008.

INOUE, K., OLIVEIRA, G. D. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer. **Infarma**. (Nov/Dez 2003-Jan/2004), 15(11-12). 2004.

IPCC. **The third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** (IPCC). Cambridge University Press: Cambridge, UK, and New York, USA, 2001.

JEEVA PRIYA, R., ANAND, M., MARUTHUPANDY, M., HAMEEDHA BEEVI, A. Biomarker response of climate change-induced ocean acidification and hypercapnia studies on brachyuran crab *Portunus pelagicus*. **Global Journal of Environmental Science and Management**, 3(2), 165-176. 2017.

JOOS, F., FRÖLICHER, T. L., STEINACHER, M., PLATTNER, G. K. Impact of climate change mitigation on ocean acidification projections. **Ocean acidification**, 272-290. 2011.

KAMIMURA, A. S. S., MARANHO, L. A., PEREIRA, C. D. S. Estudo Ecotoxicológicos do Crack empregando como modelo mexilhões marinhos *Perna*

*perna* (Bivalvia: *Mytilidae*). **Anais do Encontro Nacional de Pós Graduação**, 1(1), 176-180. 2017.

KAPSENBERG, L., OKAMOTO, D. K., DUTTON, J. M., HOFMANN, G. E. Sensitivity of sea urchin fertilization to pH varies across a natural pH mosaic. **Ecology and evolution**, 7(6), 1737-1750. 2017.

KEEN, J. H., HABIG, W. H., JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 251(20), 6183-6188. 1976.

KLERKS L., FELDER D. L., STRASSER K., SWARZENSKI P. W. Effects of ghost shrimp on zinc and cadmium in sediments from Tampa Bay, FL. **Mar Chem** 104:17–26. 2007.

KLOSTERHAUS, S. L., GRACE, R., HAMILTON, M. C., & YEE, D. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. **Environment international**, 54, 92-99. 2013.

KROEKER, K. J., KORDAS, R. L., CRIM, R., HENDRIKS, I. E., RAMAJO, L., SINGH, G. S., GATTUSO, J. P. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. **Global change biology**, 19(6), 1884-1896. 2013.

LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37(3), 293-303. 2001.

LOWE, D. M., MOORE, M. N., EVANS, B. M. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. **Marine ecology progress series. Oldendorf**, 91(1), 135-140. 1992.

LOWE, D. M., PIPE, R. K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. **Aquatic Toxicology**, 30(4), 357-365. 1994.

MARANHO, L. A., PEREIRA, C. D. S., CHOUERI, R. B., CESAR, A., GUSSO-CHOUERI, P. K., TORRES, R. J., MARTÍN-DÍAZ, M. L. The application of biochemical responses to assess environmental quality of tropical estuaries: field surveys. **Journal of Environmental Monitoring**, 14(10), 2608-2615. 2012.

MARANHO, L. A., ANDRÉ, C., DELVALLS, T. A., GAGNÉ, F., MARTÍN-DÍAZ, M. L. Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor*. **Ecotoxicology and environmental safety**, 118, 27-36. 2015.

MARANHO, L. A., FONTES, M. K., KAMIMURA, A. S. S., NOBRE, C. R., MORENO, B. B., PUSCEDDU, F. H., RIBEIRO, D. A. Exposure to crack cocaine causes adverse effects on marine mussels *Perna perna*. **Marine Pollution Bulletin**, 123(1-2), 410-

414. 2017.

MCNEIL, B. I., SASSE, T. P. Future ocean hypercapnia driven by anthropogenic amplification of the natural CO<sub>2</sub> cycle. **Nature**, 529(7586), 383-386. 2016.

MEHRBACH, C., CULBERSON, C. H., HAWLEY, J. E., PYTKOWICX, R. M. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure 1. **Limnology and oceanography**, 18(6), 897-907. 1973.

MEZZELANI, M., NARDI, A., BERNARDINI, I., MILAN, M., PERUZZA, L., D'ERRICO, G., REGOLI, F. Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. **Environment International**, 146, 106269. 2021.

MILLERO, F. J., HUANG, F., LAFERIERE, A. L. Solubility of oxygen in the major sea salts as a function of concentration and temperature. **Marine chemistry**, 78(4), 217-230. 2002.

MOORE, M. N., VIARENGO, A. Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. **Experientia**, 43(3), 320-323. 1987.

MOORE, M. N., LIVINGSTONE, D. R., WIDDOWS, J. Hydrocarbons in marine mollusks: biological effects and ecological consequences (pp. 291-328). **CRC Press Inc.: Boca Raton, FL**. 1989.

MORETTI, E. G., YUJRA, V. Q., CLAUDIO, S. R., SILVA, M. J. D., VILEGAS, W., PEREIRA, C. D. S., DE OLIVEIRA, F., RIBEIRO, D. A. Acute crack cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats. **Environmental Science and Pollution Research**, 23(8), 8104–8112. 2016.

MULROY, A. When the cure is the problem. **Water environment & technology**, 13(2), 32-36. 2001.

NOGUEIRA, L., MELLO, D. F., TREVISAN, R., GARCIA, D., DA SILVA ACOSTA, D., DAFRE, A. L., DE ALMEIDA, E. A. Hypoxia effects on oxidative stress and immunocompetence biomarkers in the mussel *Perna perna* (*Mytilidae*, Bivalvia). **Marine environmental research**, 126, 109-115. 2017.

NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. **Biological markers in environmental health research. Environment. Health Perspect.** 74, 3-9. 1987.

ORTEGA, A. D. S. B. Análise Da Citotoxicidade E Genotoxicidade Do Crack Empregando O Organismo-Teste *Perna Perna*. 2018.

PACHAURI, R. K., ALLEN, M. R., BARROS, V. R., BROOME, J., CRAMER, W., CHRIST, R., DUBASH, N. K. **Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** (p. 151). IPCC. 2014.

PAEZ-OSUNA F., RUIZ-FERNANDEZ R. Trace metals in the Mexican shrimp *Penaeus vannamei* from estuarine and marine environments. **Environmental Pollution** 87:243–247. 1993.

PAL, R., MEGHARAJ, M., KIRKBRIDE, K. P., NAIDU, R. Illicit drugs and the environment—a review. **Science of the Total Environment**, 463, 1079-1092. 2013.

PARKER, L. M., ROSS, P. M., O'CONNOR, W. A. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). **Global Change Biology**, 15(9), 2123-2136. 2009.

PAROLINI, M., PEDRIALI, A., RIVA, C., BINELLI, A. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Science of the total environment**, 444, 43-50. 2013.

PAROLINI, M., GHILARDI, A., DELLA TORRE, C., MAGNI, S., PROSPERI, L., CALVAGNO, M., BINELLI, A. Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cytogenotoxic effects in zebrafish embryo cells. **Environmental Pollution**, 226, 504-514. 2017.

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

PIECADE, F., BIO, S., NUNES, B. Effects of common pharmaceutical drugs (paracetamol and acetylsalicylic acid) short term exposure on biomarkers of the mussel *Mytilus* spp. **Environmental toxicology and pharmacology**, 73, 103276. 2020.

PIERROT, D., LEWIS, E., WALLACE, D. W. R. MS Excel program developed for CO2 system calculations. **ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee**, 10. 2006.

POURANG, N., DENNIS, J. H. Distribution of trace elements in tissues of two shrimp species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. **Environment International**, 31(3), 325-341. 2005.

POWER, Concentrating Solar. **Energy Technology Perspectives International Energy Agency**, 2008.

PRIYA, R. J., MUTHUSAMY, A., MARUTHUPANDY, M., BEEVI, A. H. Biomarker response of ocean acidification induced hypercapnia on marine bivalve *Donax cuneatus*, Linnaeus 1758. **J. Aquacult. Mar. Biol**, 4(2), 00077. 2016.

PUSCEDDU, F. H. Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno e 17 $\beta$ -etinilestradiol empregando invertebrados marinhos

bentônicos. **Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.** 2016.

RAIMUNDO, S. G., DA SILVA, G. C. L. Ecologia de costões rochosos e metodologias e amostragem. **Laboratório de Ensino de Botânica**, 66.

RAINBOW P. S, PHILIPS D. J. H. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. **Marine Pollution Bullitn** 26:593–601. 1993.

RAVEN, J., CALDEIRA, K., ELDERFIELD, H., HOEGH-GULDBERG, O., LISS, P., RIEBESELL, U., WATSON, A. **Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide.** The Royal Society. 2005.

REIS P. A, SALGADO M. A, VASCONCELOS V. Barnacles as biomonitors of metal contamination in coastal waters. **Estuarine Coastal Shelf Science.** Sci 93(4):269–278. 2011.

REISH, D. J., GERLINGER, T. V. A review of the toxicological studies with polychaetous annelids. **Bulletin of Marine Science**, 60(2), 584-607. 1997.

RIEZZO, I., FIORE, C., DE CARLO, D., PASCALE, N., NERI, M., TURILLAZZI, E., FINESCHI, V. J. C. M. C. Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. **Current medicinal chemistry**, 19(33), 5624-5646. 2012.

RINGWOOD, A. H., HOGUET, J., KEPPLER, C., GIELAZYN, M. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters—*Crassostrea virginica*. **Marine environmental research**, 58(2-5), 151-155. 2004.

ROSSINI, A., RAPOZO, D. C., AMORIM, L. M., MACEDO, J. M., MEDINA, R., NETO, J. F., PINTO, L. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet Mol Res**, 1(3), 233-40. 2002.

RÜDIGER H. W. MARQUART H., SCHÄFER S. G., MCCLELLAN R., WELSCH F. Biomonitoring in occupational medicine (eds.). **Toxicology**. San Diego: Academic Press; p.1027-39. 1999.

SAIZ-SALINAS, J. I., FRANCÉS-ZUBILLAGA, G. Nereis diversicolor: an unreliable biomonitor of metal contamination in the 'Ría de Bilbao' (Spain). **Marine Ecology**, 18(2), 113-125. 1997.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, 25, 192-205. 1968.

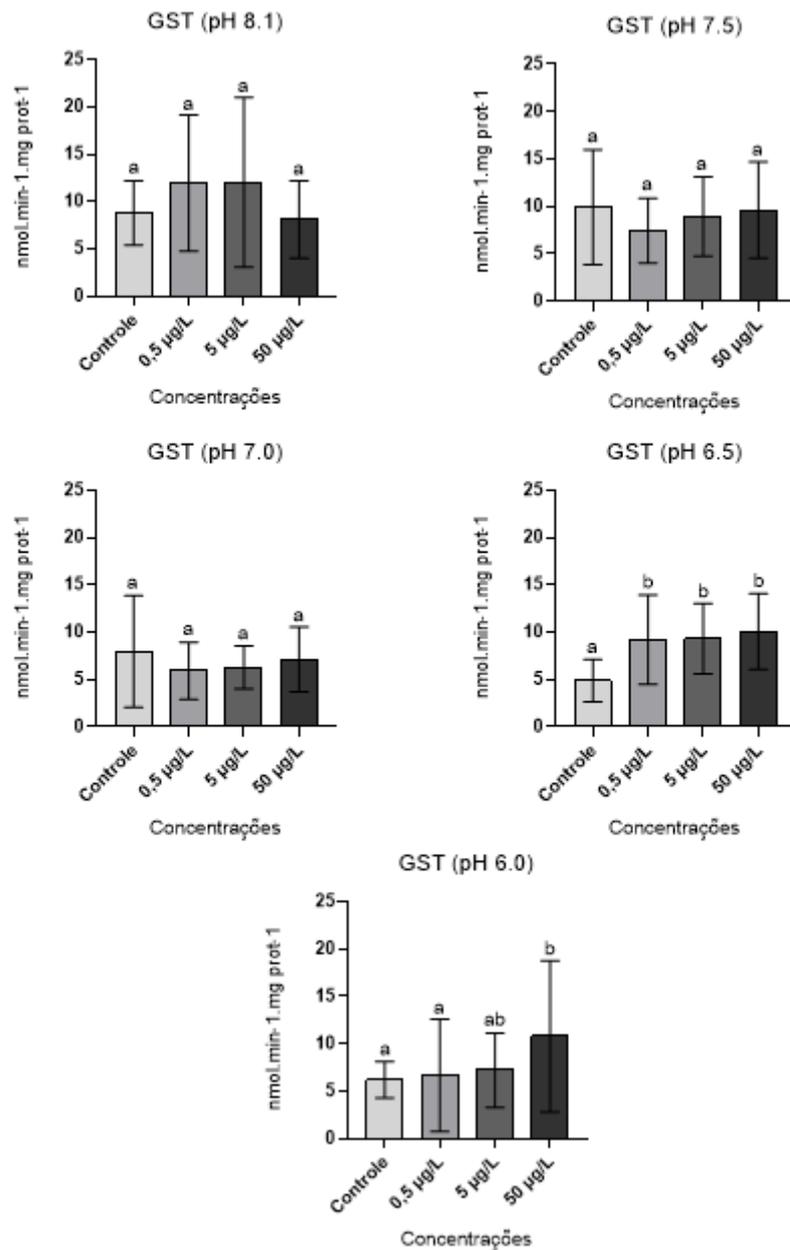
SHAN, X., AW, T. Y., JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & therapeutics**, 47(1), 61-71. 1990.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **Febs Letters**, 103(2), 287-290. 1979.

- SIRCAR, T. Combined effect of antibiotics and ocean acidification on marine bacterial communities during winter and spring bloom conditions. **M.Sc. thesis, Department of Biological and Environmental Sciences**, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden. 2014.
- STENESH, J. Plenum. In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR), **Biochemistry**. 1998.
- STILLMAN, J. H., PAGANINI, A. W. Biochemical adaptation to ocean acidification. **Journal of Experimental Biology**, 218(12), 1946-1955. 2015.
- SZALAJ, D., DE ORTE, M. R., GOULDING, T. A., MEDEIROS, I. D., DELVALLS, T. A., CESAR, A. The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) and metal bioavailability. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(1), 765-781. 2017.
- TAYLOR, P., LICHTSCHLAG, A., TOBERMAN, M., SAYER, M. D., REYNOLDS, A., SATO, T., STAHL, H. Impact and recovery of pH in marine sediments subject to a temporary carbon dioxide leak. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, 38, 93-101. 2015.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, 13(2), 57-149. 2003.
- VIARENGO, A., LOWE, D., BOLOGNESI, C., FABBRI, E., KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 146(3), 281-300. 2007.
- ZHANG, X. J., YANG, L., ZHAO, Q., CAEN, J. P., HE, H. Y., JIN, Q. H., SHI, Y. F. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. **Cell Death & Differentiation**, 9(8), 790-800. 2002.
- ZORITA, I., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. **Aquatic toxicology**, 78, S109-S116. 2006.
- ZUCCATO, E., CASTIGLIONI, S. Illicit drugs in the environment. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, 367(1904), 3965-3978. 2009.
- WEISS, I. M., TUROSS, N., ADDADI, L. I. A., WEINER, S. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. **Journal of Experimental Zoology**, 293(5), 478-491. 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts**

**and Principles-Environmental Health Criteria 155. 1993.**

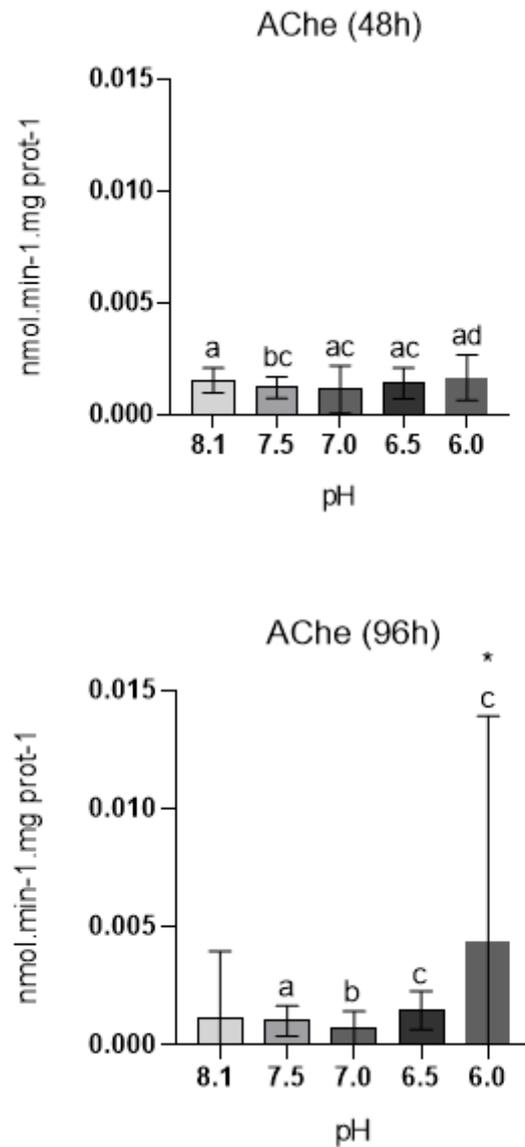
## ANEXO A – Gráfico do biomarcador GST.



Média e desvio padrão dos resultados do biomarcador de exposição GST avaliados independente do tempo (48 e 96h) de exposição a diferentes concentrações de crack (0,5; 5 e 50 µg/L) e valores de pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0). Letras diferentes significam diferenças significativas após o teste de post hoc por pares.

Fonte: Elaborado pela autora.

## ANEXO B – Gráfico do biomarcador AChE.



Média e desvio padrão dos resultados do biomarcador de efeito AChE avaliados após 48 e 96h de exposição, diferentes valores de pH (8.1, 7.5, 7.0, 6.5 e 6.0) e independente das concentrações de crack (0,5; 5 e 50  $\mu\text{g/L}$ ). (\*) diferença estatisticamente significativa em comparação ao pH 8.1 e letras diferentes significam diferenças significativas após o teste de post hoc por pares.

Fonte: Elaborado pela autora.