



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus do Litoral Paulista (CLP)



Efeitos bioquímicos; celulares e histológicos em *Crassostrea gasar* exposta ao 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

Érico Barzan de Mattos Amaral

São Vicente

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus do Litoral Paulista (CLP)



# Efeitos bioquímicos, celulares e histológicos em *Crassostrea gasar* exposta ao 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)

**Aluno: Érico Barzan de Mattos Amaral**

**Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

São Vicente

2024

## Folha de aprovação




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA



Câmpus do Litoral Paulista

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ERICO BARZAN DE MATTOS AMARAL, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.**

Aos 12 dias do mês de dezembro do ano de 2024, às 10h, no(a) Sala 01 do IB/CLP, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ERICO BARZAN DE MATTOS AMARAL, intitulada **Efeitos bioquímicos; danos celulares e histológicos em Crassostrea gasar exposta ao 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo UNIFESP Campus Baixada Santista, Profa. Dra. LUCIANE ALVES MARANHO (Participação Presencial) do(a) UNAERP / Universidade de Ribeirão Preto, Profa. Dra. PALOMA KACHEL GUSSO CHOUERI (Participação Presencial) do(a) Universidade Santa Cecília / UNISANTA, Prof. Dr. LUIS FELIPE DE ALMEIDA DUARTE (Participação Presencial) do(a) Universidade Santa Cecília / UNISANTA, Dr. CAIO RODRIGUES NOBRE (Participação Presencial) do(a) Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP Instituto de Biociências  
- Campus do Litoral Paulista

A485e	<p>Amaral, Érico Barzan de Mattos</p> <p>Efeitos bioquímicos, celulares e histológicos em <i>Crassostrea gasar</i> exposta ao 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) / Érico Barzan de Mattos Amaral.</p> <p>-- São Vicente, 2024</p> <p>80 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente</p> <p>Orientador: Dr. Camilo Dias Seabra Pereira</p> <p>1. Drogas ilícitas. 2. MDMA. 3. Efeitos bioquímicos. 4. Contaminação marinha. 5. Danos celulares e histológicos. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

## Dedicatória

Eu dedico este trabalho a Deus, pois tudo pertence a Ele.

Que este trabalho seja de grande valia à comunidade científica e que outras pesquisas continuem sendo realizadas com a finalidade principal de buscar soluções eficazes, à preservação dos mares e oceanos, por meio da Ciência.



Do Senhor é a Terra e tudo que nela existe, o mundo e os que nele vive; pois foi ele quem a estabeleceu sobre os mares e a firmou sobre as águas.

Salmos 24:1-2

Mar não é esgoto, mar é vida!

Érico Barzan

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente à Deus por toda a força, saúde e sabedoria para desempenhar este trabalho;

Agradeço às minhas filhas que tiveram paciência e durante estes anos de estudo e dedicação;

Agradeço à toda a minha família e amigos que estiveram ao meu lado me apoiando por toda esta trajetória.

Um agradecimento muito especial ao meu orientador, por ter acreditado em mim e por todo apoio e dedicação à esta pesquisa e por compartilhar a sua sabedoria, proporcionando-me a oportunidade de fazer parte deste grupo de excelentes pesquisadores e profissionais;

Um grandioso agradecimento aos meus amigos do laboratório da Maria Máximo, que me ajudaram e colaboraram muito em todas as fases desta pesquisa. Obrigado por me oferecer a oportunidade de pertencer a este grupo;

Agradeço também a todos os professores e profissionais da Unesp;

Agradeço também a todos que de alguma forma ajudaram e colaboraram com este estudo ao longo destes anos;

Muito obrigado a todos. Que as bênçãos do Senhor Jesus Cristo recaiam sobre a vida de cada um de vocês. Que vocês todos tenham muita saúde, paz e sucesso na vida!

**Marine Pollution Bulletin**  
**First evidence of ecotoxicological effects of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) in a marine organism**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Baseline Paper
<b>Keywords:</b>	illicit drugs; MDMA; Biomarkers, Oyster, Crassostrea gasar; Coastal pollution
<b>Corresponding Author:</b>	Camilo Dias Seabra Pereira, Ph.D Federal University of Sao Paulo Santos, BRAZIL
<b>First Author:</b>	Érico Barzan
<b>Order of Authors:</b>	Érico Barzan Thiago Felicissimo Turibio de Camargo Marina de Souza Paço Francisco Eduardo Melo dos Santos Beatriz Barbosa Moreno Daniel Temponi Lebrn Daniel Anaki Ribeiro Caio Rodrigues Nobre Camilo Dias Seabra Pereira, Ph.D
<b>Abstract:</b>	Illicit drug disposal into the ocean can alter the metabolism of marine organisms, enabling bioaccumulation and adverse effects. This study aimed to investigate the lethal and sublethal effects of the illicit drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on Crassostrea gasar. Biomarkers of biotransformation (EROD), conjugation (GST), antioxidant system (GPx), cytogenotoxicity (assessed through lysosomal membrane stability, lipid peroxidation, and mitochondrial DNA damage), and neurotoxicity (cholinesterase activity), were assessed in gills, digestive glands, hemolymph, and muscle. It was observed oxidative stress and cytotoxicity in environmentally relevant concentrations, denoting risks to coastal organisms exposed to MDMA.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Marco Parolini, PhD University of Milan marco.parolini@unimi.it Expertise  Beatrice de Felice, PhD University of Milan beatrice.defelice@unimi.it Expertise

## SUMÁRIO

Lista de abreviações		X
Lista de tabelas		XII
Lista de figuras		XIII
1.	INTRODUÇÃO	03
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1.	A ostra <i>Crassostrea gasar</i> como organismo modelo	15
2.2.	Análises Química	18
2.2.1.	Fase 01: Aclimação	18
2.2.2.	Fase 02: Preparação do Ensaio	19
2.2.3.	Exposição dos organismos às concentrações do contaminante MDMA	21
2.2.4.	Análise das concentrações reais	22
2.2.5.	Extração em fase sólida e análises	22
2.2.6.	Análises de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas	23
2.2.7.	Organização da exposição	24
2.2.8.	Fase 03: Extração dos tecidos	25
2.2.9.	Fase 04: Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)	27
2.2.10	Procedimento para as trocas diárias de água e preparação dos tratamentos	28
2.2.11.	Preparação das amostras para análises bioquímicas	29
2.2.12.	Homogeneização e centrifugação das amostras	29
2.2.13.	Proteínas Totais	32
2.2.14.	Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	34
2.2.15.	Glutathione S-Transferase (GST)	37
2.2.16.	Glutathione Peroxidase (GPx)	38
2.1.17.	Glutathione reduzida (GSH)	38
2.1.18.	Peroxidação lipídica (LPO)	39
2.2.19.	Danos ao DNA mitocondrial (DNA strand breaks)	40
2.2.20.	Colinesterase (ChE)	42
2.2.21.	Biometria	42
2.2.22.	Mortalidade	43
2.2.23.	Resposta Integrada de Biomarcadores – IBR	43

2.2.24.	Dados histológicos	43
2.2.25.	Análises estatísticas	45
3.	RESULTADOS	46
3.1.	Mortalidade	46
3.2.	Resultados dos biomarcadores	46
3.2.1.	Brânquias	47
3.2.2.	Glândula digestiva	49
3.2.3.	Hemolinfa	51
3.2.4.	Músculo	52
3.2.5.	Índice IBR	53
3.2.6.	Análises histológicas	55
4.	DISCUSSÃO	57
5.	Conclusão	65
	Referências	66

## Lista de abreviações

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina)

**6-MAM:** 6-monoacetilmorfina

**AChE:** Acetilcolinesterase

**BEG:** Benzoilecgonina

**C. gasar:** *Crassostrea gasar*

**ChE:** Colinesterase

**CYP 450:** Citocromo P450

**DA:** Dopamina

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (dano em DNA)

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDDP:** Metabólito do metadona

**EROD:** Etoxiresorufin O-deetilase

**GPx:** Glutaciona peroxidase

**GSH:** Glutaciona reduzida

**GST:** Glutaciona S-transferase

**IBR:** Integrated biomarkers response index (Resposta integrada de biomarcadores)

**Kow:** Coeficiente de Partição Octanol-Água

**LCR:** Líquido cefalorraquidiano

**LMS:** Lysosomal membrane stability (Estabilidade da membrana lisossomal)

**Log Kow:** Logaritmo base 10 do coeficiente de partição Kow

**LOQ:** *Limits of quantification* (Limites de quantificação)

**LPO:** Lipoperoxidação

**MAMP:** Metanfetamina

**MDMA:** 3,4-metilenodioximetanfetamina (ecstasy)

**NA:** Norepinefrina

**NPS:** Novas drogas psicoativas

**NRRT:** *Neutral Red Retention Time* (Tempo de retenção do vermelho neutro)

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida

**ODS:** Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

**ONU:** Organizações das Nações Unidas

**PCC:** Proteína carbonilada

**PTC:** Proteínas totais centrifugadas

**PTH:** Proteínas totais homogeneizadas

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**SERT:** Transportador de serotonina

**THC-COOH:** Tetrahydrocannabinol

**TRCVN:** Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro

**VMAT2:** transportador vesicular de monoaminas

## Lista de Tabelas

Tabela 01	Propriedades básicas do MDMA	20
Tabela 02	Pipetagem das amostras e da curva	34
Tabela 03	Preparação da curva de calibração de EROD	37
Tabela 04	Curva de calibração LPO	40
Tabela 05	Curva de calibração danos ao DNA	41
Tabela 06	IBR dos diferentes tratamentos e tempos de exposição	54

## Lista de Figuras

Figura 01	Mecanismos de ação neurológicas de drogas psicoativas	07
Figura 02	Organismo adulto de <i>Crassostrea gasar</i>	15
Figura 03	Desenho experimental – Fase de aclimatação	18
Figura 04	Distribuição das ostras nos recipientes, de acordo com cada tratamento	19
Figura 05	Desenho experimental – Fase de exposição	21
Figura 06	Modelo de etiqueta dos Eppendorf	25
Figura 07	Medição e pesagem de cada exemplar	25
Figura 08	Extração da hemolinfa	26
Figura 09	Extração dos tecidos e separação das aliquotas	26
Figura 10	Ensaio do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro	28
Figura 11	Homogeneização e centrifugação das amostras: Músculo Adutor	29
Figura 12	Homogeneização e centrifugação das amostras: Hemolinfa	30
Figura 13	Homogeneização e centrifugação das amostras: Glândula Digestiva	30
Figura 14	Homogeneização e centrifugação das amostras: Brânquias	31
Figura 15	Preparação para leitura EROD	34
Figura 16	Preparação para leitura da curva de calibração – EROD	36
Figura 17	Fotomicrografia (100x) mostrando o corte da brânquia (DI: Distância; CF: Comprimento dos filamentos; LF: Largura).	44
Figura 18	Média e erro padrão de EROD; GST; GPx; GSH; LPO; atividade de DNA nas brânquias de <i>Crassostrea gasar</i> em diferentes concentrações (5 ng. L <sup>-1</sup> , 50 ng. L <sup>-1</sup> , 500 ng. L <sup>-1</sup> , 5000 ng. L <sup>-1</sup> ) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). * indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo (p < 0,05).	47
Figura 19	Média e erro padrão de GST; GPx; GSH; LPO; atividade de DNA nas glândulas digestivas de <i>Crassostrea gasar</i> em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L <sup>-1</sup> ) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). * indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo (p < 0,05).	49
Figura 20	Média e erro padrão de LPO; DNA; LMS na hemolinfa de <i>Crassostrea gasar</i> em diferentes concentrações (5, 50, 500, 5000 ng/L <sup>-1</sup> ) e tempos de	51

exposição (2, 4 e 7 dias). \* indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo ( $p < 0,05$ ).

- Figura 21 Média e erro padrão da atividade de ChE no músculo adutor de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L<sup>-1</sup>) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). \*representa diferença significativa entre o grupo concentração e controle nos respectivos tempos ( $p < 0,05$ ). 52
- Figura 22 Índice integrado de respostas dos biomarcadores mensurados nas brânquias, glândulas digestivas e hemolinfa de *Crassostrea gasar* exposta ao MDMA, em diferentes concentrações e tempos de exposição. 53
- Figura 23 Média e erro padrão do comprimento das lamelas, distância interlamelar, largura das lamelas nas brânquias de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L<sup>-1</sup>) após 7 dias de exposição. a ( $p < 0,05$ ). As letras acima de cada barra (a,b,c,d,e) indicam as semelhanças ou diferenças entre cada tratamento, com base nos resultados do teste a posteriori. 55

## RESUMO

O MDMA ou ecstasy é uma droga psicoativa sintética considerada ilícita em diversos países, sendo utilizada como uma droga recreativa. Esta droga é considerada um contaminante emergente, estando presente em corpos aquáticos em diversos lugares do mundo, causando efeitos deletérios em organismos não-alvo presentes nestes ambientes. Devido à lacuna de estudos relacionados aos efeitos em organismos marinhos expostos às drogas psicoativas sintéticas, o atual estudo buscou responder quais os efeitos sub-letais do bivalve *Crassostrea gasar* exposto à determinadas concentrações de MDMA. Os bivalves foram expostos às seguintes concentrações: 5 ng. L<sup>-1</sup>; 50 ng. L<sup>-1</sup>; 500 ng. L<sup>-1</sup> e 5000 ng. L<sup>-1</sup> durante 7 dias, sendo medidos os efeitos no segundo, quarto e sétimo dia de exposição. Nestes dias foram medidos os biomarcadores de acordo com cada tecido. Nas brânquias foram verificadas enzimas de fase I do processo de biotransformação; fase II, conjugação com glutathione-S-transferase (GST); sistema antioxidante, medida pelas atividades de GPx e GSH; peroxidação lipídica (LPO); danos ao DNA mitocondrial (DNA *strand break*). Já nas glândulas digestivas foram verificadas a fase II, conjugação com glutathione (GST); sistema antioxidante, medida pela GPx e GSH; peroxidação lipídica (LPO); danos ao DNA mitocondrial (DNA *strand break*). No músculo adutor foram mensurados danos colinérgicos medidos pela colinesterase (ChE). Finalmente, na hemolinfa foi verificada a estabilidade lisossomal (TRCVN). Neste estudo foi verificado também danos histológicos nas brânquias dos indivíduos expostos às concentrações da droga. Durante o experimento foram evidenciados que os principais efeitos bioquímicos estavam relacionados ao desbalanço redox, causando estresse oxidativo, efeitos colinérgicos e diminuição da estabilidade da membrana lisossomal de hemócitos, sendo que o tecido mais afetado foi a glândula digestiva. Além disso, foram constatados também danos histológicos com a diminuição lamelar das brânquias.

Palavras chaves: 1. Drogas ilícitas. 2. MDMA. 3. Efeitos bioquímicos. 4. Contaminação marinha. 6. Danos celulares. 5. Danos histológicos.

## ABSTRACT

MDMA, or ecstasy, is a synthetic psychoactive drug considered illicit in several countries, being used as a recreational drug. This drug is considered an emerging contaminant in water bodies in various parts of the world, causing deleterious effects on non-target organisms in these environments. Due to the lack of studies related to the effects on marine organisms exposed to synthetic psychoactive drugs, the current study aimed to answer what the sub-lethal effects are on the bivalve *Crassostrea gasar* exposed to specific concentrations of MDMA. The bivalves were exposed to the following concentrations: 5 ng. L<sup>-1</sup>; 50 ng. L<sup>-1</sup>; 500 ng. L<sup>-1</sup> and 5000 ng. L<sup>-1</sup> for 7 days, with effects measured on the second, fourth, and seventh day of exposure. On these days, biomarkers were measured according to each tissue. Gills were assessed for enzymes of phase I of the biotransformation process; phase II conjugation with glutathione-S-Transferase (GST); antioxidant system measured by GPx and GSH; lipid peroxidation (LPO); mitochondrial DNA damage (DNA strand break). In the digestive glands, phase II enzyme of conjugation glutathione-S-Transferase (GST); antioxidant system measured by GPx and GSH; lipid peroxidation (LPO); mitochondrial DNA damage (DNA strand break). Cholinergic damage was measured in the adductor muscle by cholinesterase (ChE). Finally, lysosomal stability (TRCVN) was checked in the hemolymph. This study also verified histological damage in the gills of individuals exposed to the drug concentrations. During the experiment, it was evidenced that the main biochemical effects were related to redox imbalance, causing oxidative stress, cholinergic effects, and decreased lysosomal membrane stability of hemocytes, with the most affected tissue being the digestive gland. In addition, histological damage with lamellar reduction of the gills was also observed.

Keywords: 1. Illicit drugs. 2. MDMA. 3. Biochemical effects. 4. Marine contamination. 5. Cellular damage. 6. Histological damage.

## 1. INTRODUÇÃO

### **Contaminantes de preocupação emergente**

Contaminantes emergentes são substâncias que não apresentam padrões ambientais ou limites de concentrações seguras em legislações nacionais ou internacionais, bem como não fazem parte dos programas de monitoramento de agências governamentais (Khan *et al.*, 2022).

Com o aumento do consumo e a falta de um tratamento adequado para o descarte de fármacos, hormônios, nano-materiais, produtos de higiene e cuidado pessoal, plastificantes, retardantes de chamas, surfactantes e metabólitos, aditivos industriais, hormônios esteroides, pesticidas e drogas ilegais, os ambientes aquáticos recebem uma concentração cada vez maior destes contaminantes, impactando rios, lagos e os oceanos (Chaturvedi *et al.*, 2021; Keerthanan *et al.*, 2021; Reyes *et al.*, 2021; Oluwole *et al.*, 2020).

Conforme relatam Rathi *et al.*, (2021), as águas residuais impactadas por contaminantes emergentes oriundos de atividades domésticas, industriais e comerciais são descartadas sem tratamento adequado em corpos d'água e lençóis freáticos. A contaminação aquática por poluentes emergentes está afetando diversas regiões marinhas em seus mais diferenciados ambientes. Rizzi *et al.*, (2020) detectaram contaminantes emergentes em esponjas presentes em um recife de coral nas Maldivas. Dentre os contaminantes presentes nos animais, foram evidenciados cafeína e fluoxetina nas proximidades de um aterro. Além destes contaminantes, foram encontrados nitro xileno, N-dietil-meta-toluamida e galaxolida nas esponjas estudadas. Dados como esse geram uma crescente preocupação com a contaminação oceânica.

## Consumo de drogas ilícitas no mundo

De acordo com o relatório mundial sobre drogas (UNODC, 2020), o consumo geral de drogas ilícitas vem crescendo vertiginosamente nos últimos anos em todo o planeta. Segundo o relatório, em 2018 mais de 269 milhões de pessoas haviam utilizado drogas em todo o planeta, pelo menos uma vez no ano. Este número corresponde a 5,4% da população mundial com idade entre 15 a 64 anos, ou seja, de cada 19 pessoas 1 já consumiu drogas. Conforme o relatório, no período entre 2009 e 2018 o número global de usuários de drogas aumentou em 210 milhões de pessoas, representando um acréscimo de 28% de usuários, considerando o aumento populacional no período. Entretanto, embora estes dados sejam oficiais, os números podem estar subestimados, devido ao fato de que possam existir muitos usuários de drogas ilícitas fora das estatísticas formais governamentais. Ainda conforme o citado relatório, a droga com maior crescimento no número de usuários foi a *cannabis* com cerca de 192 milhões de usuários em todo o mundo, correspondendo a 3,9% da população mundial no período, com idade entre 15 a 64 anos. Com relação ao consumo do ecstasy, foco central desta pesquisa, o citado relatório informa que em 2018 cerca de 20,5 milhões de pessoas usaram a droga no ano anterior. Este número corresponde a 0,4% da população mundial, com idade entre 15 a 64 anos. O consumo desta droga é maior na Austrália e Nova Zelândia (2,2%); América do Norte (0,9%) e Europa Ocidental (0,8%). A Holanda foi o país com o maior aumento percentual do uso da droga nos últimos anos, com um salto de 1,4% em 2006 para 3,6% do consumo mundial. A utilização deste entorpecente está intimamente relacionada a atividades recreativas noturnas entre os jovens destas localidades, sendo que um em cada quatro usuários relatou o uso semanal ou mais frequente da substância, com um número médio de duas cápsulas em cada uso. Com a grande diversificação de formas ofertadas no mercado de consumo, o ecstasy oferecido em cápsulas permaneceu a forma mais comum, com a preferência de 77% dos usuários.

Todavia, conforme demonstra o relatório mundial sobre drogas (UNODC, 2023), o percentual de usuários de drogas cresceu 23% em dez anos, conforme dados de 2021, representando um crescimento de mais de 296 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que as drogas mais usadas foram: cannabis (219 milhões); opióides (60 milhões); anfetaminas (36 milhões); cocaína (22 milhões) e ecstasy (20 milhões).

## Ocorrência de drogas ilícitas em ambientes aquáticos

Após o consumo, os metabólitos das drogas são descarregados através dos efluentes domésticos até a estação de tratamento de esgoto, quando existentes. Quando o sistema de tratamento não é adequado para estes contaminantes, os mesmos são despejados nos ambientes aquáticos podendo afetar a biota. (Mohan *et al*, 2021).

Maasz e colaboradores (2021) detectaram, ao longo de três anos de pesquisa, a presença de drogas ilícitas e seus metabólitos contaminando as águas do lago Balaton, localizado na Hungria. A presença destas substâncias foi confirmada sempre após festivais de música que ocorreram próximo ao local de estudo, sugerindo, assim que a contaminação da água permanecia muito ativa mesmo após o término do festival, causando impactos adversos à vida selvagem do local.

Já Christophoridis e colaboradores (2021) detectaram, entre outras drogas e fármacos, a presença diária de benzoilecgonina (BEG) (84,0–202,2 ng. L<sup>-1</sup>), tetraidrocannabinol (THC-COOH) (80,3–171,9 ng. L<sup>-1</sup>), 6-monoacetilmorfina (6-MAM) (5,8-12,0 ng. L<sup>-1</sup>) nas amostras de efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais da área de Thessaloniki (Norte da Grécia). Com isso também foi possível estimar o consumo diário de cocaína, heroína e cannabis sendo, 86–164, 2300–5400 mg<sup>-1</sup>. L por dia por 1000 habitantes, respectivamente.

Em um estudo realizado por Miino e colaboradores (2023), foram detectadas concentrações de drogas ilícitas em efluentes do município de Brno – República Checa, nas seguintes proporções: EDDP (metabólito do metadona) e MDMA (0,02 ± 0,01 µg. L<sup>-1</sup> e 0,10 ± 0,02 µg. L<sup>-1</sup>, respectivamente); cocaína (0,09 ± 0,02 µg. L<sup>-1</sup>); benzoilecgonina (0,48 ± 0,08 µg. L<sup>-1</sup>).

Verovšek *et al* (2023), realizaram uma pesquisa em águas residuais afluentes, efluentes e em rios receptores de seis estações de tratamento de águas residuais municipais da Eslovênia. Durante os estudos, detectaram a presença de drogas como, nicotina (1075 ng. L<sup>-1</sup>), medicamentos de abuso, como a morfina (494 ng. L<sup>-1</sup>) e drogas ilícitas, tais como MDMA (218 ng. L<sup>-1</sup>).

Em um estudo realizado no município de Guarujá, estado de São Paulo (Brasil), foi detectado próximo aos difusores do emissário submarino, entre diversas

outras substâncias de preocupação emergente, concentrações entre 0,3–0,6 ng/L<sup>-1</sup> de cocaína, em 75% das amostras coletadas (Roveri *et al*, 2021).

Em um estudo realizado em rios da Espanha foram detectadas concentrações de drogas ilícitas, tais como, cocaína, entre 2,8 ng. L<sup>-1</sup> a 34,2 ng. L<sup>-1</sup>; ecstasy, entre 0,8 ng. L<sup>-1</sup> a 56,8 ng. L<sup>-1</sup>; benzoilecgonina, 4,7 ng. L<sup>-1</sup> a 129 ng. L<sup>-1</sup>; heroína, 1,6 ng. L<sup>-1</sup> e efedrina, entre 4,1 ng. L<sup>-1</sup> a 144 ng. L<sup>-1</sup> (Mastroianni *et al.*, 2016).

Senta e colaboradores (2015) expuseram um estudo em águas residuais, bem como em águas de rios, identificando concentrações de drogas ilícitas nestas matrizes aquáticas, como anfetamina 545 ng/L<sup>-1</sup>; ecstasy (MDMA) com 55 ng/L<sup>-1</sup>; efedrina, com 108 ng/L<sup>-1</sup>.

### **Drogas psicoativas como contaminantes de preocupação emergente**

As drogas psicoativas são assim denominadas por causarem alterações no funcionamento mental, com mudanças no pensamento, consciência, emoções e regulação (Youssef, 2024). Estas novas substâncias psicoativas (NPS) já tem um consumo mundial estimado em mais de 30 milhões de pessoas. De acordo com Balloni *et al* (2024), as exposições de ratos e humanos a substâncias psicoativas sintéticas podem causar, entre outros efeitos, danos hepáticos, insuficiência hepática aguda, estresse oxidativo, efeitos deletérios na estabilidade da membrana plasmática e mudanças na energia celular levando à apoptose e morte celular, além de inibições enzimáticas relacionadas ao citocromo P-450.

Conforme relatam Al-Hakeim e colaboradores (2023), a psicose induzida por metanfetaminas está relacionada ao aumento do estresse oxidativo, principalmente a peroxidação lipídica, bem como, à inibição das defesas antioxidantes do organismo.

A figura a seguir explica como as drogas psicoativas atuam no mecanismo de ativação dos neurotransmissores, nas sinapses neuronais.

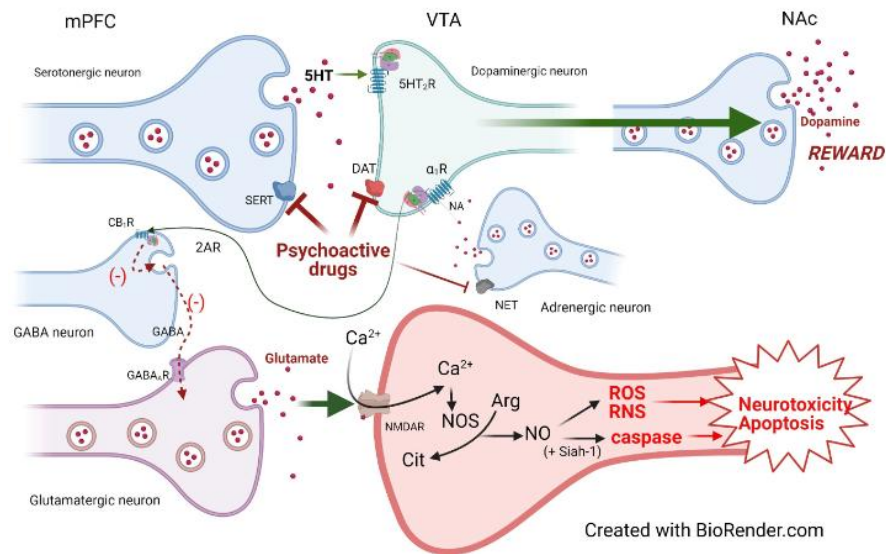


Figura 01. Mecanismos de ação neurológicas de drogas psicoativas (Jîtcă et al., 2021)

De acordo com Jîtcă e colaboradores (2021), as drogas psicoativas, como as catinonas compartilham efeitos semelhantes à cocaína como inibição da recaptação de dopamina (DA) e norepinefrina (NA) por meio do bloqueio de transportadores específicos) e também, semelhanças às anfetaminas, como o MDMA (interação com o transportador vesicular de monoaminas VMAT2, reversão da direção de recaptação e favorecendo o efluxo dos neurotransmissores DA e/ou NA).

A seguir serão mencionadas algumas drogas psicoativas de abuso, tais como as metanfetaminas e o ecstasy.

## Metanfetaminas

As metanfetaminas são drogas ilícitas psicoestimulantes, as quais causam dependência, podendo causar consequências neurais graves como agitação, ansiedade, alucinações, paranoia e psicose. Em humanos, as metanfetaminas podem causar sérias alterações nas funções dopaminérgicas, serotoninérgicas, apoptose neuronal, astrocitose e microgliose. Além disso, as metanfetaminas causam neurotoxicidade, neuroinflamação e geração de radicais livres, com a formação de

espécies reativas de oxigênio, peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxila, aumentando o estresse oxidativo, resultando assim, na degeneração dos terminais monoaminérgicos e apoptose neuronal (Jayanthi *et al.*, 2021).

Qian e colaboradores (2024), demonstraram que a exposição de camundongos à metanfetamina resultou na piora do desempenho neurológico dos animais, além do estresse oxidativo com a liberação de radicais livres.

### **Ecstasy (3,4-metilenodioximetanfetamina - MDMA)**

O ecstasy (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>) é uma droga sintética, ilícita pertencente ao grupo das metanfetaminas (MAMP), encontrada na forma de comprimidos ou cristais, bem como, na forma de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), muito consumida principalmente na Europa, Ásia e América do Norte (Fontes *et al.*, 2020).

MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), conhecida como Molly ou Ecstasy é uma substância sintética criada em 1912 como um precursor para a síntese de agentes hemostáticos. Na década de 1970 ela foi usada como um adjunto em tratamentos psiquiátricos. Durante a década de 1980 passou a ser usada como uma droga recreativa, devido aos seus efeitos na promoção da empatia e na facilitação da comunicação (Figurasin *et al.*, 2021).

O MDMA é um derivado substituído por anel da fenil-isopropilamina, sendo estruturalmente semelhante à metanfetamina. O MDMA é um substrato do transportador de serotonina (SERT) onde, através dele adentra aos terminais monoaminérgicos liberando serotonina (5-HT) de vesículas de armazenamento em fendas sinápticas de regiões cerebrais as quais recebem terminais serotoninérgicos (Bisagno *et al.*, 2021).

De acordo com o relatório mundial sobre drogas (UNODC, 2023), estima-se que, em 2021, 36 milhões de pessoas usaram anfetaminas, 22 milhões tinham consumido cocaína e 20 milhões tinham consumido substâncias do tipo "ecstasy".

Da Cunha e colaboradores (2021) realizaram um estudo de fluido oral com voluntários após festivais de música eletrônica ao longo de 16 meses, a fim de detectar quais os tipos de substâncias psicoativas mais utilizadas pelos frequentadores. Constatou-se neste estudo que das 462 amostras de fluido oral coletadas, o MDMA

foi a droga ilícita psicoativa mais comumente utilizada, com 88,5% das amostras coletadas.

Estudo realizado por Cunha e colaboradores (2023), foram analisados 101 comprimidos de ecstasy apreendidos no Nordeste do Brasil, pela Polícia. Foram constatados que nestes comprimidos apreendidos a principal substância presente foi o MDMA, em 57% das amostras, em quantidades variando entre 27,3 a 187,1 mg por comprimido.

Nas últimas décadas vêm crescendo o interesse no entactógeno como um auxílio no tratamento de transtornos de estresse pós-traumáticos. Entretanto, esta droga, mesmo sendo administrada de maneira controlada como uma alternativa terapêutica pode ser prejudicial aos pacientes que não respondem bem ao mecanismo de ação específico do MDMA, principalmente àqueles pacientes com doenças cardiovasculares (Oeri, 2020).

No entanto, estudos estão sendo realizados com o intuito de comprovar a eficácia para tratamentos de pacientes com transtornos pós-traumáticos, como apontam as pesquisas realizadas por Lewis *et al.* (2023) e Mitchell *et al.* (2023), onde, testes com placebo e administrações controladas de MDMA em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático grave, mostraram que o tratamento com a droga é eficaz, seguro e bem tolerado para estes pacientes. Contudo, o uso indiscriminado desta droga, sem um acompanhamento profissional adequado, pode ter efeitos severos à saúde em humanos, principalmente relacionados a complicações cardiovasculares (Dragomir *et al.*, 2023).

Em humanos, o MDMA pode causar diversas complicações conforme relatam Bonsignore e colaboradores (2019), onde explanaram sobre os efeitos da cardiotoxicidade induzida pelo MDMA e seus efeitos patológicos no miocárdio, em humanos, onde, o seu uso habitual e rotineiro causa efeitos deletérios ao tecido do miocárdio, levando à fibrose miocárdica e hipertrofia celular. Porém, em uma única dose, dependendo da concentração administrada, pode levar à necrose da banda de contração e arritmias ventriculares.

Em estudo mais recente, Costa *et al.*, (2022), relataram outros efeitos colaterais deletérios, tais como, ansiedade; déficits cognitivos humor deprimido; redução da densidade do SERT (transportador da serotonina para os receptores 5-HT ou 5-hidroxitriptamina) no lobo parietal, temporal e occipital, córtex cingulado anterior

e posterior, tálamo e hipocampo; hipertermia; hiperpirexia; redução do calcitriol no plasma e dos metabólitos do ácido homovanílico no líquido cefalorraquidiano (LCR); tolerância, podendo causar dependência e crises de abstinência.

Rein e colaboradores (2024) detectaram efeitos comportamentais como a empatia entre camundongos através da estimulação optogenética da liberação de 5-HT (serotonina).

Existem muitas pesquisas ainda em andamento pelo mundo para avaliar os benefícios e os efeitos deletérios desta droga em seres humanos. Entretanto ela é considerada ilegal em diversos países. De acordo com a UNODC (2019), a quantidade desta droga aumentou de algumas dezenas em 1998 para quase 250.000 apreensões no mundo em 2017. Ainda de acordo com o relatório, a quantidade de comprimidos de metanfetamina apreendidos anualmente no Leste e Sudeste Asiático aumentou 40% em 2017 atingindo quase 450 milhões comprimidos. Dados preliminares indicam um aumento adicional de 745 milhões de comprimidos de metanfetamina apreendidos nesta região em 2018, equivalente a um aumento de dois terços em 2018. Já, o relatório UNODC (2023), relata que 20,2 milhões de pessoas, ou 0,4% da população adulta global, utilizou MDMA de forma ilícita em 2021.

### **Contaminação aquática pelo 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA)**

Após o consumo e a excreção destas substâncias pelos usuários, os metabólitos do contaminante são lançados no meio aquático através das descargas de efluentes domésticos, contaminando lagos, rios e mares (Fontes *et al.*, 2020).

Concentrações superiores a 27.000 ng. L<sup>-1</sup> de MDMA foram detectadas em descargas de efluentes domésticos em uma estação de tratamento de efluentes localizada na província de Castellón, região de Valência (Espanha) após um festival de música realizada aos arredores da região (Bijlsma *et al.*, 2014).

Zhao e colaboradores (2023) detectaram, em estações de tratamento de águas residuais em Xinjiang, China, entre outras drogas ilícitas, concentrações de MDMA entre 0,44 ng. L<sup>-1</sup> a 8,52 ng. L<sup>-1</sup>.

Por sua vez, Verovšek *et al.* (2023) detectaram substâncias psicoativas também em estações de tratamento de águas residuais na Eslovênia, entre estas substâncias, foi encontrado 218 ng. L<sup>-1</sup> de MDMA. Sims e colaboradores (2024)

também detectaram, além de outras drogas ilícitas psicoativas, MDMA após festivais de música em Las Vegas – EUA, nas concentrações entre 13,7 a 558 ng. L<sup>-1</sup>.

### **Contaminação e efeitos causados pelo MDMA em organismos aquáticos**

A presença do MDMA em certas concentrações pode causar efeitos diversos em algumas espécies presentes no ambiente aquático. Foram verificados efeitos oxidativos em *Dreissena polymorpha* após exposição a concentrações desta droga ilícita, conforme relataram Parolini *et al.*, (2015). Costa e colaboradores (2023) detectaram efeitos em características morfofisiológicas em *Daphnia magna* em exposições de MDMA a partir de 1.000 ng. L<sup>-1</sup>.

Em um estudo realizado por Bellot *et al* (2024), foram detectados diversos efeitos deletérios em *Daphnia magna* expostas a concentrações farmacológicas de MDMA (10.000 a 200.000 ng. L<sup>-1</sup>), tais como respostas comportamentais de natação, estresse oxidativo, perturbações cardíacas, aumento nos níveis de dopamina e serotonina.

### **Atividades enzimáticas estudadas em *Crassostrea gasar*.**

*Crassostrea gasar* (sin. *Crassostrea brasiliana*, Lazoski *et al.*, 2011), conhecida popularmente como ostra do mangue é uma espécie estuarina que ocorre na costa brasileira do Estado do Maranhão até Santa Catarina (Machado *et al.*, 2002), sendo um importante recurso pesqueiro com alta relevância econômica para comunidades pesqueiras tradicionais. Esse organismo possui ampla distribuição geográfica, disponibilidade no campo e na produção aquícola, bem como adequação para experimentos de laboratório e *in situ*.

Esta espécie foi escolhida como organismo modelo devido à sua facilidade de obtenção e manutenção em laboratório, importância para os ecossistemas costeiros (costões rochosos e manguezais), sua relevância econômica e social, e por ser amplamente utilizada em estudos de qualidade ambiental (Gosling, 2008).

Biomarcadores podem ser definidos como variações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que podem ser medidas em amostras de tecidos ou

fluidos corporais, ou no nível de organismos inteiros, para fornecer evidências de exposição e/ou efeitos de um ou mais contaminantes (Depledge, 1994).

Dentre os principais biomarcadores utilizados em estudos ambientais, destacam-se enzimas e proteínas de detoxificação, antioxidantes e danos citogenotóxicos.

O processo de desintoxicação de xenobióticos absorvidos pelo organismo advindos da presença de fármacos, drogas e demais contaminantes presentes no meio aquático, compõe-se de três fases. Na primeira fase as enzimas do citocromo CYP 450 realizam, através da oxidação, a conversão das substâncias xenobióticas em compostos mais solúveis ou reativos (Lushchak *et al.*, 2018).

Durante a primeira fase, o marcador que será trabalhado no atual estudo será a atividade EROD (etoxiresorufina O-desetilase). A atividade da etoxiresorufina O-desetilase (EROD) é um método comum para quantificar a atividade das enzimas do citocromo P450 1 (CYP 1), as quais metabolizam xenobióticos (Siebert *et al.*, 2017a). Durante a segunda fase a enzima glutatona S-transferase (GST) realiza o processo de conjugação com a glutatona, procedendo à desintoxicação de eletrófilos (Strange *et al.*, 2001). Uma terceira fase pode ser realizada utilizando glicoproteínas, também conhecidas como de resistência a múltiplas drogas (MDR) ou xenobióticos (MXR).

Devido ao processo de biotransformação de xenobióticos (Fase 1) pode ocorrer a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), ativando assim o sistema antioxidante, o que pode levar o animal ao estresse oxidativo (Lushchak, 2011).

No sistema antioxidante, atuam as enzimas superoxidismutase, catalase e a glutatona peroxidase (GPx), esta última da superfamília de proteínas incluída na classe da tiol-peroxidase sem heme, incluindo as peroxirredoxinas, catalisando a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou hidroperóxidos orgânicos em água ou álcoois correspondentes, mitigando assim sua toxicidade (Toppo *et al.*, 2008), atuando junto com o tripeptídeo cofator, a glutatona-s-reduzida (GSH), no processo de eliminação de radicais livres gerados (Georgiou-Siafis *et al.*, 2023). O estresse oxidativo pode também induzir a danos ao DNA, bem como, à peroxidação lipídica (LPO), com a oxidação destas biomoléculas (De Almeida *et al.*, 2007).

Neurotransmissores também podem ser afetados pela ação de contaminantes. De acordo com Dos Santos *et al.* (2022), a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima que está envolvida nas sinapses neuronais e neuromusculares, sendo

crítica ao sistema colinérgico, podendo ser, portanto, um dos biomarcadores mais úteis para avaliar a presença e os efeitos de compostos neurotóxicos.

Estudos histológicos também estão amplamente sendo utilizados para mensurar alterações morfológicas de bivalves expostos a diversos poluentes aquáticos (Otegui *et al* 2024; Leis *et al*, 2024). Estas alterações morfológicas podem causar patologias estruturais nos bivalves, como nas brânquias e glândulas digestivas, levando à inflamações, malformações, degeneração de tecidos, erosão dos cílios das brânquias, causando a redução do consumo de oxigênio, resultando também em mudanças na osmoregulação (Added *et al.*, 2023).

### **Hipótese da pesquisa.**

Considerando que o consumo do MDMA continua a crescer globalmente, a própria droga e seus metabólitos são detectadas em estações de tratamento de esgoto e ambientes marinhos, esse estudo assume como hipótese que o MDMA é um contaminante de preocupação emergente capaz de causar efeitos letais e subletais em organismos costeiros a partir da exposição a concentrações ambientalmente relevantes.

## Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos letal e subletais do MDMA em diferentes níveis de organização biológica na ostra do mangue *Crassostrea gasar* exposta a concentrações ambientalmente relevantes

Dentro deste escopo, os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar a mortalidade de ostras expostas ao MDMA;
- Avaliar as respostas bioquímicas do organismo, resultantes da exposição ao MDMA, através dos biomarcadores de biotransformação (EROD), conjugação (GST), sistema antioxidante (GPx e GSH), citogenotoxicidade (avaliada através da estabilidade da membrana lisossômica, lipídios e danos ao DNA mitocondrial) e neurotoxicidade (colinesterase atividade);
- Avaliar os efeitos histológicos ocasionados ao bivalve.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. A ostra *Crassostrea gasar* como organismo modelo

A ostra de mangue (Figura 2), *Crassostrea gasar* (Lamarck, 1819), é um molusco bivalve ovíparo, possui uma câmara promial e pequenos óstios branquiais. Se apresenta como uma espécie dominante, sendo que sua desova ocorre durante todo o ano, porém, com maiores picos nos períodos de janeiro a junho e de outubro a dezembro, com grande intensidade no verão do hemisfério Sul. Esta ostra é cultivada no Brasil, na região Sul do país e no extremo sul do estado de São Paulo, no município de Cananéia. Vive em ambientes estuarinos, crescendo e prosperando em água salobra, com salinidade entre 15 a 25% (Menzel, 1991; Castilho *et al.* 2015).

Como a espécie escolhida é predominante em mangues, pode-se observar a sua importância neste ambiente. Conforme relata De Mattos Amaral (2022), os mangues são ecossistemas cruciais para diversas espécies da fauna e flora, podendo ser considerado um berçário natural para uma diversidade de animais e plantas.



Figura 02. Organismo adulto de *Crassostrea gasar*.

### Caracterização anatômica, fisiológica, bioquímica

Os bivalves apresentam um corpo protegido por duas valvas, tendo uma grande variedade de formas de conchas, constituindo de espécies marinhas, assim como de água doce (Lima, 2015).

Conforme Hickman e colaboradores (2016), os bivalves ocorrem em diversos ambientes aquáticos ao redor do mundo, formando densos bancos na zona entremarés.

- Fluxo de água: o fluxo de água entra pela cavidade palial através de cílios, passando pelos poros das brânquias, fluindo em direção dorsal através dos tubos aquíferos até a câmara suprabranquial saindo pela abertura exalante. O sangue nas brânquias realiza a troca de dióxido de carbono por oxigênio;
- Circulação sanguínea: o ventrículo bombeia o sangue nas direções anterior para seios sanguíneos no pé e vísceras e posterior para seios do manto. O sangue retorna do manto para os átrios; aquele nas vísceras retornando para os rins e brânquias e, finalmente, para os átrios (Hickman *et al*, 2016).

O fluxo de água é realizado pela cavidade do manto, com drenagem em direção às brânquias e palpos através de cílios. À medida que a água atravessa os diminutos poros das brânquias, partículas alimentares são retidas fora e aglutinadas em cordões de muco, que são conduzidos por cílios até os palpos, e direcionadas para a boca. Areia e detritos precipitam dentro da cavidade do manto, de onde são removidos por cílios (Hickman *et al*, 2016).

### **Análise estrutural e funcional dos tecidos de *Crassostrea gasar* utilizados no estudo.**

#### **Brânquias**

As brânquias da maioria dos bivalves são altamente modificadas para a alimentação por filtração, sendo derivadas de ctenídeos primitivos pelo alongamento dos filamentos de cada lado do eixo central. A água entra através do sifão inalante, atravessando os tubos aquíferos por meio de poros nas lamelas, indo para dentro de uma câmara suprabranquial comum, saindo para o ambiente externo via abertura exalante (Hickman *et al*, 2016).

As brânquias são fundamentais nas defesas do organismo contra os poluentes ambientais. Por ser o principal local de absorção de substâncias químicas veiculadas pela água. Este tecido é responsável pela modulação de importantes defesas celulares, exercendo um papel essencial no metabolismo de xenobióticos (Da Silveira *et al.*, 2020).

### **Glândulas digestivas**

A glândula digestiva dos bivalves tem, entre outras funções, a atuação no sistema antioxidante, formando um sítio ativo para absorção de xenobióticos, gerando o oxi-radical, dentro do processo de biotransformação enzimática (Shenai-Tirodkar *et al.*, 2017). As glândulas digestivas são um dos principais tecidos responsáveis pela absorção e metabolização de xenobióticos em organismos aquáticos (Mezzelani *et al.*, 2024).

### **Sistema circulatório – Hemolinfa**

O sistema circulatório é aberto, possuindo um coração, além de seios sanguíneos. Os moluscos comumente apresentam um par de nefrídios em conexão com o celoma, bem como sistema nervoso complexo, com grande variedade de órgãos sensoriais (Hickman *et al.*, 2016).

Os bivalves têm um sistema imunológico eficiente, onde os hemócitos são os principais efetores imunes celulares que circulam na hemolinfa. Essas células são ativadas rapidamente durante as reações de defesa e processos inflamatórios (Dos Santos *et al.*, 2018).

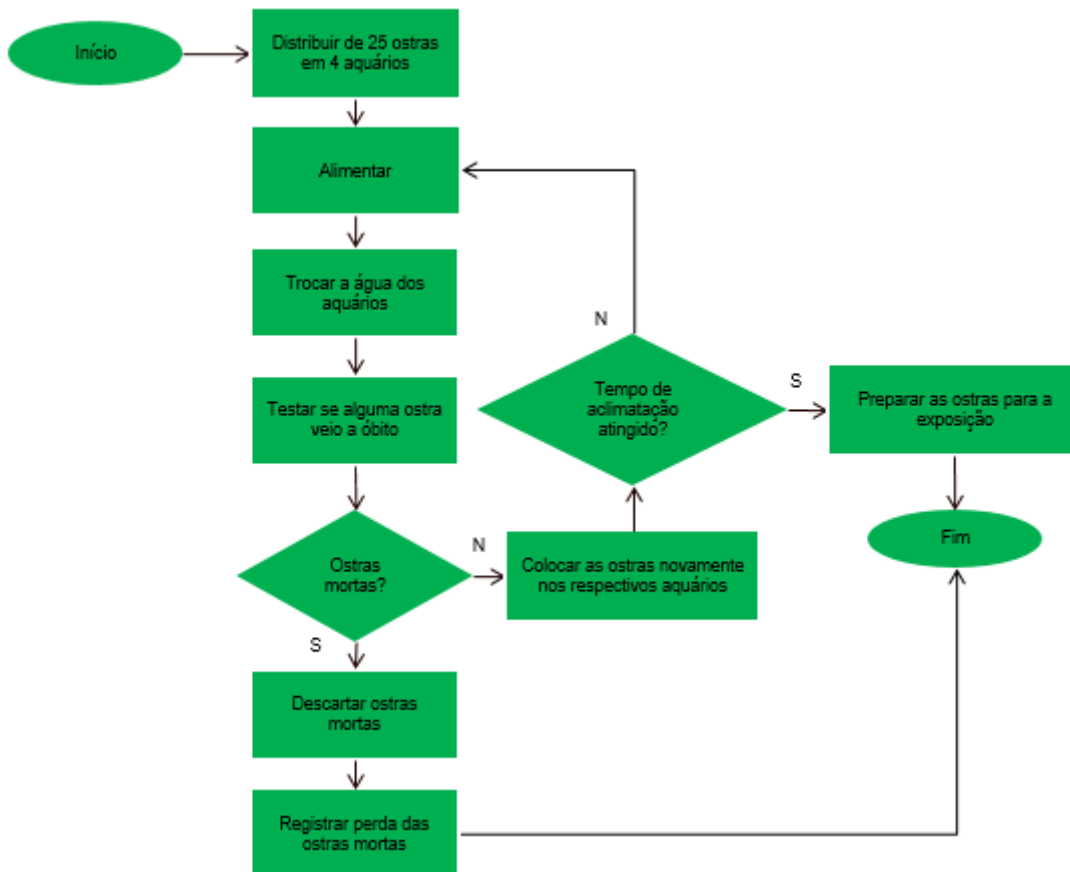
### **Músculo adutor**

O músculo adutor é um órgão situado na concha do bivalve, sendo o responsável pelo ligamento dorsal que mantêm as valvas unidas (Hickman *et al.*, 2016).

## 2.2. Análise Química

### 2.2.1. Fase 01: Aclimação

A aclimação foi realizada conforme desenho experimental mostrado na figura abaixo.



. Figura 03.Desenho experimental – Fase de aclimação

O objetivo de realizar a aclimação foi garantir que as ostras tivessem as mesmas características ambientais as quais estavam expostas em seu hábitat, evitando assim, possíveis estresses fisiológicos constatados devido às alterações do ambiente, os quais poderiam influenciar nos resultados dos testes posteriormente.

Foram utilizadas 133 ostras da espécie *Crassostrea gasar*, advindas do município de Cananéia-SP, sendo mantidas em uma caixa d'água com 500 litros, em

uma salinidade de 25 ppm, em temperatura ambiente (22 C°) durante 7 dias de aclimação. A água utilizada foi coletada do Aquário Municipal de Guarujá-SP.

Os indivíduos foram alimentados com 53 microlitros de microalgas da espécie *Nannochloropsis gaditana* (4-10 micrômetros de suspensão de fitoplâncton para corais moles, esponjas e outros invertebrados filtradores) a para 2 litros de água uma vez a cada 48 horas, durante todo o período de aclimação e ensaio (14 dias).

Com isso, foi possível garantir uma maior confiabilidade das exposições, minimizando as influências das mudanças de ambiente nas respostas fisiológicas e bioquímicas nos indivíduos. Sendo assim, após o período de aclimação, os bivalves estavam preparados para iniciar os ensaios com o contaminante MDMA.

### 2.2.2. Fase 02: Preparação do ensaio

#### Distribuição dos indivíduos

Em T0 foram separados e utilizados 07 indivíduos, retirados diretamente da caixa d'água de aclimação para que fossem realizados os testes iniciais.

Para os testes de exposição com 2 dias, 4 dias e 7 dias, foram utilizados 44 recipientes de vidro para a distribuição dos animais, sendo colocados 3 ostras em cada um. Em cada recipiente continham 2 litros de água salobra com salinidade de 25 ppm.

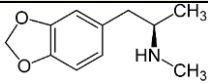


. Figura 04. Distribuição das ostras nos recipientes, de acordo com cada tratamento

## Solução estoque

O MDMA (Tabela 1) utilizado foi doado pela Polícia Civil com autorização judicial expedida pela Juíza de Direito Dra. Helena Furtado de Albuquerque Cavalcanti do Tribunal de Justiça do Estado de São Paulo (TJ-SP), Comarca de São Paulo, Foro Central Criminal Barra Funda. As soluções foram preparadas no Laboratório de Tóxico genômica da UNIFESP, sob coordenação do Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, detentor da autorização judicial para guarda da substância. Foram utilizadas duas soluções estoques, cada qual, diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) como solvente, sendo a primeira solução estoque na concentração  $1\text{mg.L}^{-1}$  e a segunda solução estoque a  $100\text{mg.L}^{-1}$  de MDMA.

Tabela 1. Propriedades básicas do MDMA\*

Substância	Estrutura	Peso molecular (g/mol)	Log Kow	pKa	Solubilidade em água (mg/L, 25°C)	Densidade
<b>MDMA</b>		193,25	2,28	10,14	7,034	1,1± 0,1
$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$						
CAS: 42542-10-9						

\*As propriedades físico-químicas foram obtidas no EPI Suite™ (Estimation Program Interface for Microsoft®Windows, v 4.0. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suite™-estimation-program-interface-v411>

### 2.2.3. Exposição dos organismos às concentrações do contaminante MDMA.

A exposição dos organismos foi realizada conforme o desenho experimental mostrado na figura a seguir.

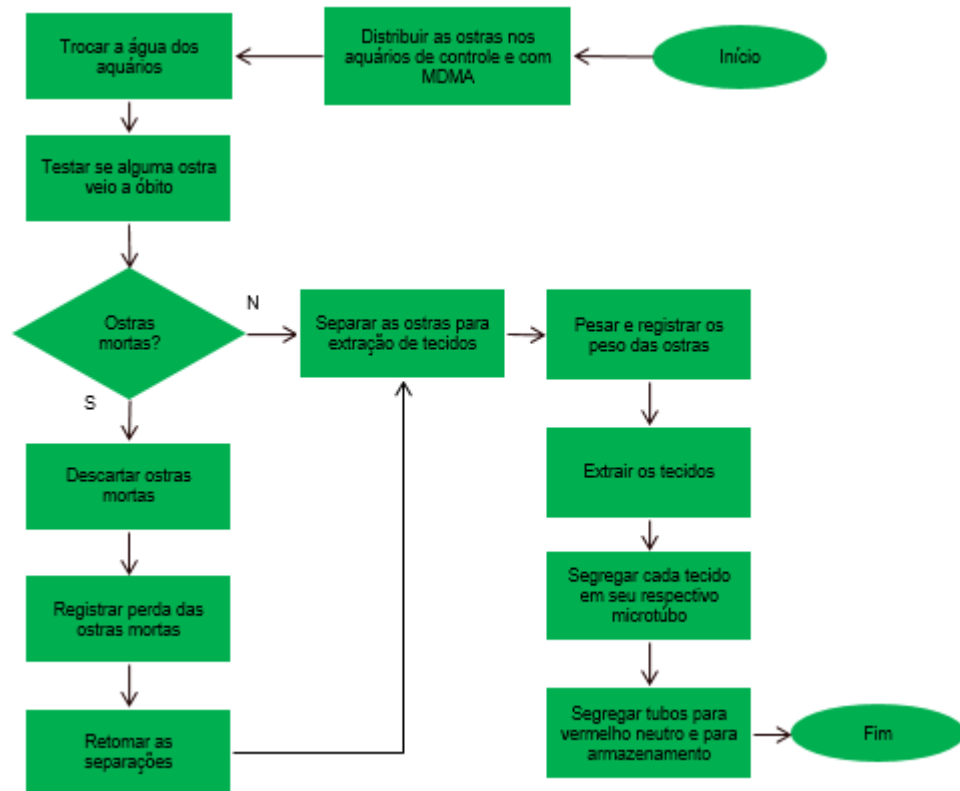


Figura 05. Desenho experimental – Fase de exposição

A exposição dos organismos foi realizada e organizada da seguinte forma:

- Tratamento 01 (**controle solvente**): nestes recipientes foram adicionados 2 litros de água salobra, mais  $100 \text{ mg. L}^{-1}$  do solvente DMSO em cada pote, tendo como objetivo descartar as possibilidades de influência do solvente nos resultados das demais exposições;
- Tratamento 02 (**concentração =  $5 \text{ ng. L}^{-1}$** ): foram adicionados neste recipiente 2 litros de água salobra, mais  $10 \text{ mg. L}^{-1}$  da solução estoque 01 de MDMA;

- Tratamento 03 (**concentração = 50 ng. L<sup>-1</sup>**): foram adicionados neste recipiente 2 litros de água salobra, mais 100mg.L<sup>-1</sup> da solução estoque 01 de MDMA;
- Tratamento 04 (**concentração = 500 ng. L<sup>-1</sup>**): foram adicionados neste recipiente 2 litros de água salobra, mais 10mg.L<sup>-1</sup> da solução estoque 02 de MDMA;
- Tratamento 05 (**concentração = 5000 ng. L<sup>-1</sup>**): foram adicionados neste recipiente 2 litros de água salobra, mais 100mg.L<sup>-1</sup> da solução estoque 02 de MDMA.

Todos os tratamentos foram trocados a cada 24 horas, garantindo assim a confiabilidade das concentrações, bem como, a possível bioacumulação nos tecidos dos moluscos. As ostras foram alimentadas a cada 2 dias.

#### **2.2.4. Análise das concentrações reais**

Foram separadas aliquotas de cada tratamento a fim de comprovar as concentrações reais e possíveis incertezas por meio de análises químicas, bem como, averiguar os demais produtos resultantes do contaminante MDMA.

#### **2.2.5. Extração em fase sólida e análises**

Para a análise das concentrações reais, todas as amostras de água foram levadas para análise química e, para isso, foi realizada a extração em fase sólida, da seguinte maneira, conforme adaptação de Wille *et al* (2010). Primeiramente, antes da realização da extração, foi ajustado o pH das amostras de água para 7+-0,5 utilizando soluções de HCl (1M) e NaOH (1M). Foram filtrados 1L das amostras de água do mar através de um papel filtro Whatman (GF/C47 mm de diâmetro, com retenção de partículas de 1,2 microgramas, Merk, Darmsfadt, Alemanha).

Foi realizada a lavagem dos filtros com 2ml de metanol, a fim de evitar a perda dos compostos de interesse. Dessa forma, o extrato de metanol foi recolhido, sendo adicionado à amostra filtrada. Após isso, a extração em fase sólida foi realizada,

utilizando cartuchos HR-X Cromabond (3ml, 200 mg, MeChErey – Nagel, Diren, Alemanha). Os cartuchos foram, então, pré-condicionados com 5 ml de metanol e 5 ml de água Mili-Q. Depois de terem sido carregados com 1L da amostra, os cartuchos foram lavados com 5 ml de água Mili-Q, sendo secos sob vácuo por 15 minutos.

A eluição foi realizada utilizando 5 ml de acetona e 10 ml de metanol, sendo realizada a secagem com nitrogênio e os resíduos recuperados com 300 ml de acetonitrila/ácido fórmico 0,2M (50/50). Após a extração em fase sólida, as amostras foram encaminhadas para a análise química para análise das concentrações utilizadas durante o estudo.

### **2.2.6. Análises de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas**

Uma alíquota (10  $\mu$ L) de cada amostra foi analisada por um dispositivo HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massa híbrido triplo quadrupolo / LIT (armadilha de íons linear) 3200 QTRAP ABSciex, Ontário (Canadá). O padrão de MDMA utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich/Supelco (ref.M-013). As amostras foram analisadas por colunas Agilent Eclipse XDB-C18 4,6  $\times$  50 mm, 1,8  $\mu$ m a 25 °C. A taxa de fluxo do eluente foi de 0,7 mL $\cdot$ min $^{-1}$ , e a fase móvel para análise no modo positivo foi ácido fórmico a 0,1% (grau Sigma-Aldrich LC-MS) em água (solvente A) e metanol (grau MS; J.T. Baker LC) (solvente B).

Um gradiente linear de 0,7 mL $\cdot$ min $^{-1}$  foi utilizado para este modo de ionização (positivo), começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A porcentagem de solvente A foi diminuída linearmente de 95% para 5%. ao longo de 5 min e mantido a 5% por 1 min. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 min. Os analitos foram detectados e quantificados usando ionização ESI e modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos iônicos para quantificar e qualificar cada composto. Os dados foram registrados e processados utilizando o software Analyst 1.5.2 (ABSciex, Ontario, Canadá). O Tempo de detecção foi de 3,77 min. O limite de detecção (LOD) foi 0,03 ng./mL $^{-1}$  e o limite de quantificação (LOQ) foi 0,09 ng./mL $^{-1}$ . A curva de

calibração apresentou coeficiente de determinação satisfatório ( $0,9937 \leq r^2 \leq 1$ ). As recuperações foram obtidas na faixa de 55% a 114%.

### **2.2.7. Organização da exposição**

Com as ostras devidamente colocadas em cada aquário, as exposições à contaminação se iniciaram, sendo os tempos e procedimentos de exposição divididos da seguinte forma:

- T0: início da exposição, momento em que os organismos foram colocados em cada aquário, de acordo com as divisões realizadas. Este tempo foi considerado para comprovar como os organismos estavam antes da exposição ao contaminante;
- T01: primeiro dia após a exposição: realizada troca de água e colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários;
- T02: segundo dia após a exposição: realizada troca de água, colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários e extração dos tecidos;
- T03: terceiro dia após a exposição: realizada troca de água e colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários;
- T04: quarto dia após a exposição: realizada troca de água, colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários e extração dos tecidos;
- T05: quinto dia após a exposição: realizada troca de água e colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários;
- T06: sexto dia após a exposição: realizada troca de água e colocação das concentrações de contaminantes em todos os aquários;
- T07: sétimo dia após a exposição: realizada a última extração dos tecidos.

Durante as extrações, cada tecido foi colocado em seus devidos recipientes da marca Eppendorf®, de acordo com a seguinte divisão:

- Dia da extração: T2/T4/T7;

- Tratamentos: controle solvente (C); 5 ng.L<sup>-1</sup>; 50 ng.L<sup>-1</sup>; 500 ng.L<sup>-1</sup>; 5000 ng.L<sup>-1</sup>;
- Ostra por tratamento por dia: O1/O2/O3/O4/O5/O6/O7;
- Tecidos: Brânquia / Glândula digestiva / Músculo adutor / Hemolinfa.

Assim, para cada dia de extração, os tecidos foram colocados em Eppendorf, com a seguinte descrição, conforme o exemplo abaixo:

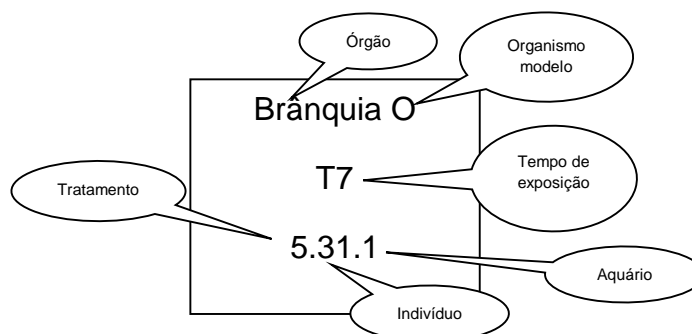


Figura 06. Modelo de etiqueta dos Eppendorf

### 2.2.8. Fase 03: Extração dos tecidos

Em cada dia de extração (T0; T2; T4; T7), foram selecionados 07 exemplares de cada tratamento (Controle Solvente; 5 ng.L<sup>-1</sup>; 50 ng.L<sup>-1</sup>; 500 ng.L<sup>-1</sup>; 5000 ng.L<sup>-1</sup>), sendo devidamente identificados, a fim de garantir a sua rastreabilidade.

Cada exemplar, então, foi pesado e medido para averiguar a sua massa e tamanho antes e após a extração, sendo possível, assim, identificar possíveis influências do contaminante em sua estrutura física.



Figura 07. Medição e pesagem de cada exemplar

A próxima etapa, após a medição e pesagem, foi a retirada da hemolinfa sendo colocadas em seus respectivos tubos, devidamente identificados. A retirada da hemolinfa foi necessária para a análise da estabilidade da membrana lisossômica.



Figura 08. Extração da hemolinfa

Após a retirada da hemolinfa, os mesmos indivíduos foram encaminhados para extração dos seguintes tecidos: brânquias, glândula digestiva e músculo adutor, sendo colocados em seus respectivos tubos da marca Eppendorf®, para posteriores testes de efeitos biomarcadores.



Figura 09. Extração dos tecidos e separação das aliquotas

Com a finalização das extrações, a próxima etapa foi pesar cada concha vazia, confrontando com a pesagem anterior à extração.

Foram realizadas o total de 42 extrações por dia (T2;T4 e T7) e 07 extrações em T0, sendo utilizadas 7 ostras por tratamento para cada dia de extração, totalizando assim 133 extrações de tecidos no final das exposições, separando os tecidos e organizados em seus respectivos Eppendorf®. Após cada dia de extração, os recipientes foram armazenados em ultrafreezer a -80°C até para posteriores análises químicas e bioquímicas.

### **2.2.9. Fase 04: Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)**

O dano causado pelo ecstasy em nível subcelular foi avaliado pela estabilidade da membrana lisossômica por meio do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro (TRCVN), de acordo com o método proposto por Lowe *et al.*(1995). Este ensaio tem como objetivo detectar alterações na permeabilidade da membrana lisossomal de hemócitos do bivalve *Crassostrea gasar*. Para isso, foi preparada uma solução fisiológica constituída por 4,77 g de HEPES, 25,48 g de NaCl, 13,06 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,75 g de KCl e 1,47 CaCl<sub>2</sub> diluídos em 1 L de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 7,36, e mantida em temperatura ambiente. Em um frasco âmbar foram adicionados 28,8 mg do corante vermelho neutro, diluídos em 1 mL de DMSO. Foram utilizados 10 µL da solução estoque em 5 mL da solução fisiológica, no escuro. Para a coleta da hemolinfa uma seringa com agulha de 21G, contendo com 0,5 mL de solução fisiológica, foi inserida no músculo adutor do organismo. A solução com hemolinfa foi depositada em microtubos e incorporada à solução fisiológica por leve inversão. Após isso, 40 µL da solução foram colocados em uma lâmina previamente tratada com 10 µL de poly-L-lisina, para melhor aderência das células, sendo guardadas em uma câmara úmida e escura em 15 minutos. Após esse tempo, o excesso de hemolinfa foi retirado, e ainda dentro da câmara escura, cada lâmina recebeu 40 µL do corante vermelho neutro e armazenadas por mais 15 minutos. As lâminas foram montadas e levadas para leitura ao microscópio, em aumento de 400x. Em todas as leituras, as lâminas foram encaminhadas à câmara escura e úmida por mais 15 minutos.

Este processo foi realizado até o extravasamento das células do corante para o citosol em 50% ou mais células estudadas. Depois do extravasamento, a análise foi encerrada e o tempo de retenção registrado, não passando de 180 minutos. Os critérios para diferenciar as células saudáveis e estressadas foram além do extravasamento, tamanho e formato dos hemócitos. As características das células foram verificadas, realizando-se três classificações: “+” mais de 90% das células observadas não apresentaram sinais de estresse; “+/-” para a ausência de estresses, de 90 a 50% das células e “-” mais de 50% das células exibiram deformidades e extravasamento do corante para o meio extracelular. Com a finalização das análises,

as ostras foram dissecadas com rompimento do músculo adutor, considerando que brânquias, glândulas digestivas e músculos adutores foram acondicionados em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise de outros biomarcadores. A figura abaixo, mostra parte do procedimento da análise de retenção do vermelho neutro.



. Figura 10. Ensaio do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro

#### **2.2.10. Procedimento para as trocas diárias de água e preparação dos tratamentos.**

Diariamente, durante os 7 dias de ensaio, tanto a água, quanto o MDMA e DMSO foram trocados, a fim de garantir a estabilidade dos contaminantes no corpo d'água, sendo:

- 1º Tratamento e preparação da água do mar, por meio de filtragem para a retirada de impurezas;
- 2º Tratamento e preparação da água destilada;
- 3º Ajuste do pH para 7,36;
- 4º Ajuste da salinidade entre 24 a 25 ppm;
- 5º Retirada dos indivíduos de cada recipiente;
- 6º Realização das trocas de acordo com os respectivos tratamentos, conforme;
- 7º Recolocação de cada indivíduo em seu respectivo recipiente;
- 8º Colocação do DMSO e MDMA em cada tratamento;
- 9º Alimentação a cada 48 horas.

A fim de ajustar o Ph e a salinidade, foram realizadas misturas da água do mar e água destilada, utilizando testes e medições com refratômetro e pHmetro até chegar aos valores ideais para o experimento.

### 2.2.11. Preparação das amostras para análises bioquímicas

A fim de montar os testes para verificação dos efeitos bioquímicos, conforme os objetivos destes estudo, todas as amostras passaram devidamente por um preparativo, conforme demonstram os procedimentos a seguir.

### 2.2.12. Homogeneização e centrifugação das amostras

A homogeneização e centrifugação das amostras foram realizadas conforme cada desenho experimental expostos nas figuras a seguir.

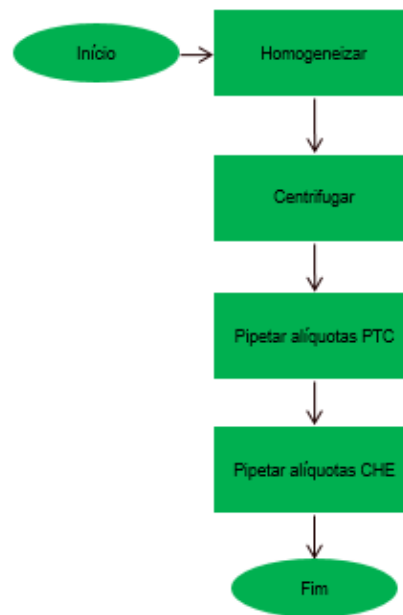


Figura 11. Homogeneização e centrifugação das amostras: Músculo Adutor

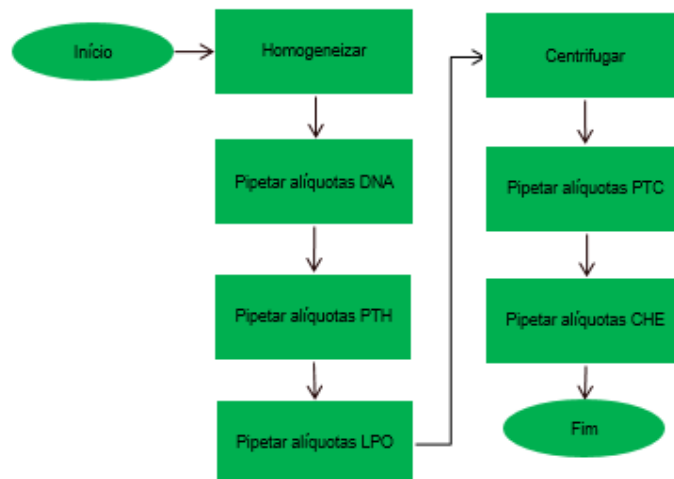


Figura 12. Homogeneização e centrifugação das amostras: Hemolinfa

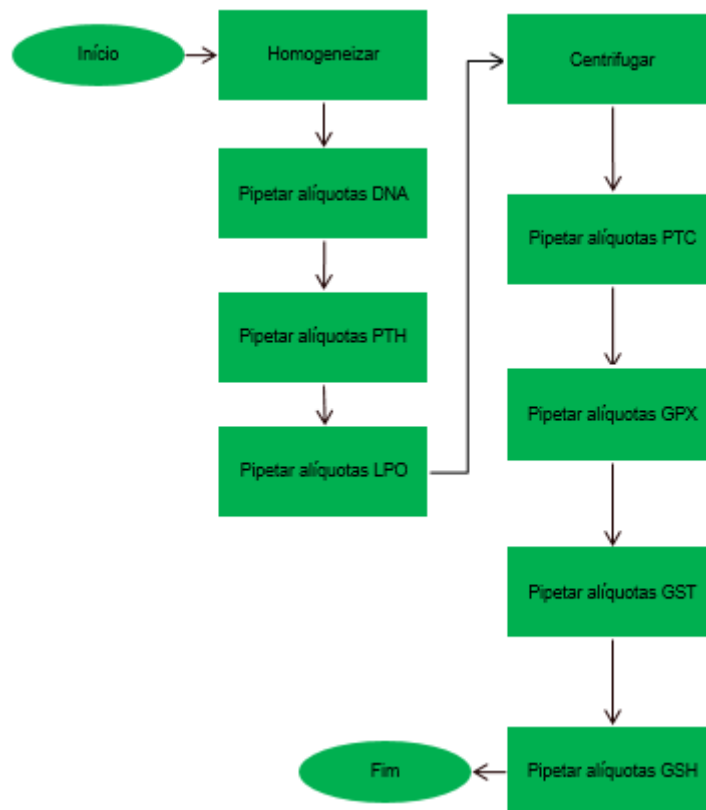


Figura 13. Homogeneização e centrifugação das amostras: Glândula Digestiva

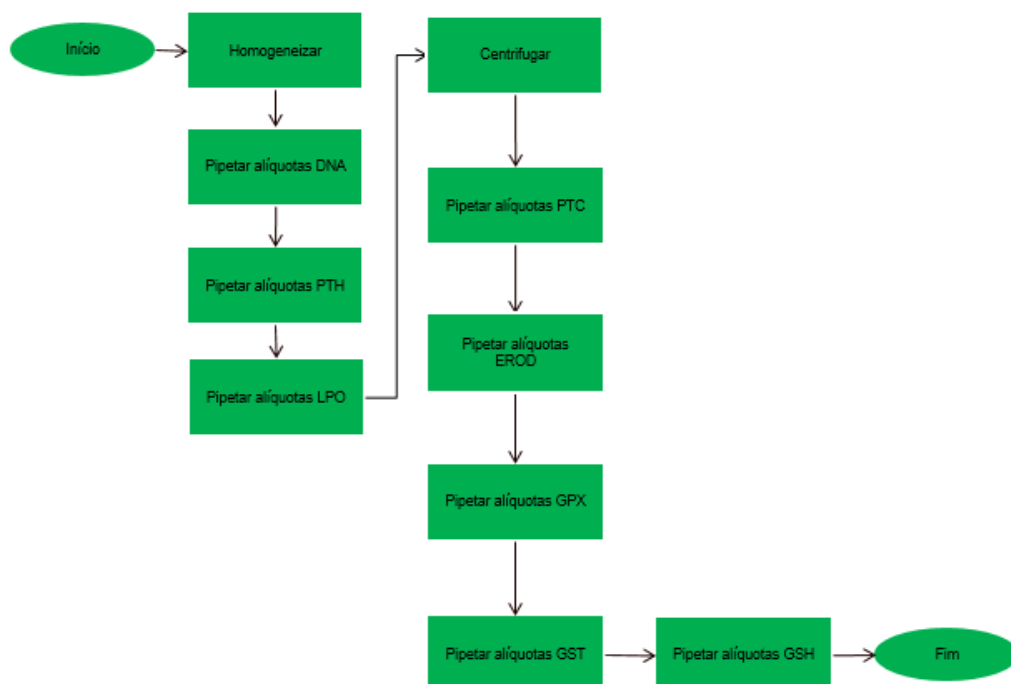


Figura 14. Homogeneização e centrifugação das amostras: Brânquias

As amostras foram preparadas para a realização das análises bioquímicas dos biomarcadores em estudo EROD; GST; GPx, além de GSH; PTH; PTC; LPO e DNA. Para tanto, foram separadas reservas, conforme relacionado no procedimento a seguir:

Foi realizada a separação do músculo adutor, sendo primeiramente homogeneizado, depois centrifugado, possibilitando, então pipetar as alíquotas para a verificação de: PTC e CHE.

Foi separada também a hemolinfa, procedendo assim com a homogeneização e pipetando alíquotas para medição de: DNA; PTH e LPO. Após isso, foi realizada a centrifugação e pipetagem de alíquotas para: PTC e CHE.

As glândulas digestivas, também foram homogeneizadas, procedendo com a pipetagem das alíquotas para: DNA; PTH e LPO. Realizando, então a centrifugação, e pipetagem de alíquotas para os biomarcadores: GPX; GST; GSH; bem como, PTC.

Para as brânquias, foi realizada a homogeneização, seguida da pipetagem de alíquotas para: DNA; PTH e LPO. Na sequência, as alíquotas foram centrifugadas e pipetadas para verificação dos biomarcadores: GPx; GST; GSH; PTC e EROD.

Para homogeneizar os tecidos, foi realizado, primeiramente, o descongelamento sobregelo e homogeneizados com solução tampão de homogeneização, sendo preparada com TRIS (3,0284 g), EDTA (0,1862 g), DTT

(0,0772 g), sacarose (85,575 g), cloreto de potássio (5,5912) diluídos em 500 mL de água Milli-Q® com ajuste do pH a 7,6 com gotas de HCL. No caso dos músculos, para realizar a homogeneização e centrifugação, foram utilizados satélites de óxido de zirconio 6,0 ml.

Foi preparada uma solução de 1,667 Ml's PMSF (100mM), inibidor de protease, diluído em 1mL de etanol. A solução tampão utilizada para homogeneização foi preparada da junção destas duas soluções, sendo adicionados 100 µL da solução de PMSF em 30 mL do tampão de homogeneização, mantida sobre o gelo e envolta em papel alumínio.

Cada alíquota de tecido foi pesada para a adição de solução tampão (1:3). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador, e as alíquotas separadas para posterior análise. Danos em DNA (strand breaks), peroxidação lipídica (LPO) e a mensuração de proteínas totais foram determinados nas amostras de homogeneização de glândula digestivas e brânquias. Após a separação das amostras de homogeneizado, cada extrato foi centrifugado a 4°C, a 15.000 g durante 20 minutos, obtendo-se assim, a fração S15 (sobrenadante de 15.000 g). A partir do S15 de glândulas digestivas e brânquias foram determinadas as atividades enzimáticas de EROD, GST, GPx e ChE. Já para o músculo adutor foi determinada apenas a atividade de ChE. A concentração de proteínas totais existentes na fração celular citoplasmática foi determinada nos tecidos em questão. Todas as amostras foram congeladas em ultrafreezer (-80°C) para posterior determinação das diferentes respostas bioquímicas.

### **2.2.13. Proteínas Totais**

O teor de proteínas totais foi determinado para cada extrato de acordo com o método adaptado de Bradford (1976).

Para a realização deste ensaio, foi utilizado o Reagente de Bradford (500 ml), seguindo o seguinte procedimento.

Primeiramente, foi preparada uma solução com 50mg (0,05g) de Comassie Blue G250 em 25ml de Etanol 95% (para fazer o etanol a 95% foi utilizado 1,25ml de água destilada, adicionando 23,75ml de Etanol Absoluto). Esta solução então foi colocada em uma proveta de 500ml e avolumando com 50ml de Ácido Fosfórico 85%

(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), com adição de 300ml de água destilada, sendo agitado durante 15 minutos, avolumado com água destilada até 500ml (volume final da solução), sendo então agitado por mais 3 minutos. Após este procedimento, a solução foi filtrada na malha de 0,45µm a vácuo e armazenada em vidro âmbar envolto em papel alumínio.

Para a realização da solução estoque, foi pesado 0,006g de BSA (soro bovino) em um eppendorf e completado com 2ml de água destilada para a curva de calibração. As alíquotas das amostras foram separadas da seguinte forma: 100 µl de amostra homogeneizada e centrifugada com tampão para metalotioneínas (apenas para proteínas de metalotioneínas); 40 µl de amostra homogeneizada, não centrifugada, com tampão para enzimas (proteína LPO e DNA); porção conhecida de amostra homogeneizada e centrifugada com tampão de enzimas (proteínas, GPx, GST, ChE.). Uma vez preparadas nos eppendorfs, seguiu-se os seguintes passos:

Primeiramente, foi realizado teste das amostras para verificar se necessitam ser diluídas, procedendo com a pipetagem de 20 µl da amostra (selecionado por amostragem 2-3 amostras), 10 µl de Milli Q em poços diferentes de uma microplaca de 96 poços, realizando uma curva –teste, acrescentando a cada um dos poços 180 µl de reativo de Bradford, de forma a completar 200µl em cada poço. Após isso, foram comparadas as cores. Sendo que, se a cor da amostra estivesse mais intensa que os pontos da curva de BSA, já seria um indício de que as amostras precisariam ser diluídas. Após verificar a necessidade de diluição, foram testadas diluições de 10 µl de amostra para 10 µl de Milli Q e 5 µl de amostra para 15 µl de Milli Q.

Após verificar o quanto as amostras necessitavam ser diluídas, procedeu-se com as análises. Realizando a pipetagem de 96 poços de 200 µl sendo incubadas as amostras e a curva com o reagente Bradford, além de pipetar as amostras e a curva em duplicata na placa transparente. Para proteína total, foi utilizado como padrão 20µl da amostra. No caso de diluição, foi colocada na amostra, água destilada na proporção ajustada. Para o branco foi acrescentado 20µl de água destilada, devido à curva Milli Q. Sendo realizada a curva de BSA (Bovine Serum Albumin). As concentrações seguintes foram pipetadas pegando o volume da solução anterior.

Tabela 02: Pipetagem das amostras e da curva

Standart	Stock $\mu$ l	Água destilada
3 mg/ml	0,006g	2mL
PONTOS	Volume da solução anterior	Água destilada
2 mg/ml	200 $\mu$ l da solução anterior	100 $\mu$ l
1, 5 mg/ml	187,5 $\mu$ l da solução anterior	62,5 $\mu$ l
1 mg/ml	166,6 $\mu$ l da solução anterior	83,4 $\mu$ l
0,8 mg/ml	160 da solução anterior	40 $\mu$ l
0,5 mg/ml	93,7 $\mu$ l da solução anterior	56,3 $\mu$ l
0,2 mg/ml	60 $\mu$ l da solução anterior	90 $\mu$ l
0 (Branco)	0	20 $\mu$ l

Após a pipetagem das amostras e da curva, iniciou-se a pipetagem de 180 $\mu$ l do reagente Bradford na microplaca usando a pipeta multicanal, sendo incubadas as amostras e a curva com o reagente bradford por 5 minutos no escuro.

A leitura foi realizada no espectrofotômetro com absorbância 595nm. Após homogeneizar as amostras foram medidas as proteína totais através da curva padrão de BSA. Para isso, foi utilizada uma reta de BSA para estimar o o valor de proteínas (através da reta). Com esta curva obteve-se uma reta padrão a partir da qual de um  $\lambda$  foi extraída a concentração das proteínas das amostras.

### 2.2.14. Etoxi-resorufina-O-deetilase (EROD)

A EROD foi observada analisada nas brânquias, em todos os exemplares, tempos e concentrações em do estudo. Esta atividade foi verificada conforme o ensaio adaptado proposto por Gagné & Blaise (1993).

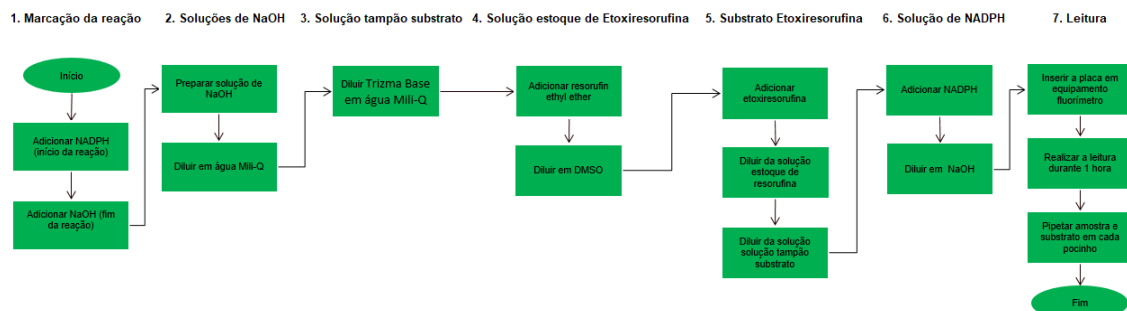


Figura 15. Preparação para leitura EROD

Primeiramente, para marcar o início da reação, foi adicionado NADPH, durante 60 min a 30°C, e para marcar a finalização da reação, foi adicionado 100 µL de 0.1 M de NaOH.

Foram utilizados filtros de 520 nm (excitação) e 590 nm (emissão), a fim de verificar a 7-hidroxiresorufina fluorometricamente.

Foram utilizadas, nas amostras, a curva de calibração padronizada de 7-hidroxiresorufina, sendo os resultados apresentados em pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteína total.

### **Soluções de NaOH**

Foi feita, primeiramente, a solução de NaOH (0,2 mM), com 0,04g de NaOH diluídos em 50 mL de água Mili-Q.

### **Solução tampão substrato**

Posteriormente, foi feita uma solução tampão substrato, com 1,5142g de Trizma Base, 1,50 mL de Tween 20 diluídos em 500 mL de água destilada. Com pH dessa solução ajustado para 7,4.

### **Solução estoque de Etoxiresorufina**

Para a realização da preparação dessa solução, foi adicionado 0,006g de resorufin ethyl ether (5 mM), diluída em 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo conservada sob abrigo da luz e refrigerada a 4°C. Este tipo de solução contém uma coloração rosa-púrpura.

### **Substrato Etoxiresorufina**

Para a realização da preparação dessa solução, foi adicionado 50 µL de etoxiresorufina (coloração laranja), sendo diluída em 400 µL da solução estoque de resorufina e 40 mL da solução tampão substrato, sendo conservada sob abrigo da luz e refrigerada.

## Solução de NADPH

Para a realização da preparação dessa solução, a qual foi preparada no dia da sua utilização, foi adicionado 25 mg de NADPH (10 mM), com diluição de 30 mL em NaOH (0,02 mM), conservada em refrigeração de -20°C.

## Leitura

Por fim, a placa foi inserida em equipamento fluorímetro, sendo realizada a leitura durante 60 minutos, com 15 minutos de intervalo. A fim de garantir a exatidão dos dados, cada placa passou por sua preparação da curva de calibração, sendo pipetados, em cada pocinho 50 µL de amostra, 160 µL de substrato e 10 µL de NADPH. A leitura teve duração de 1h, com intervalos de 5 minutos em equipamento de fluorescência (580 nm- 485nm).

## Curva padrão

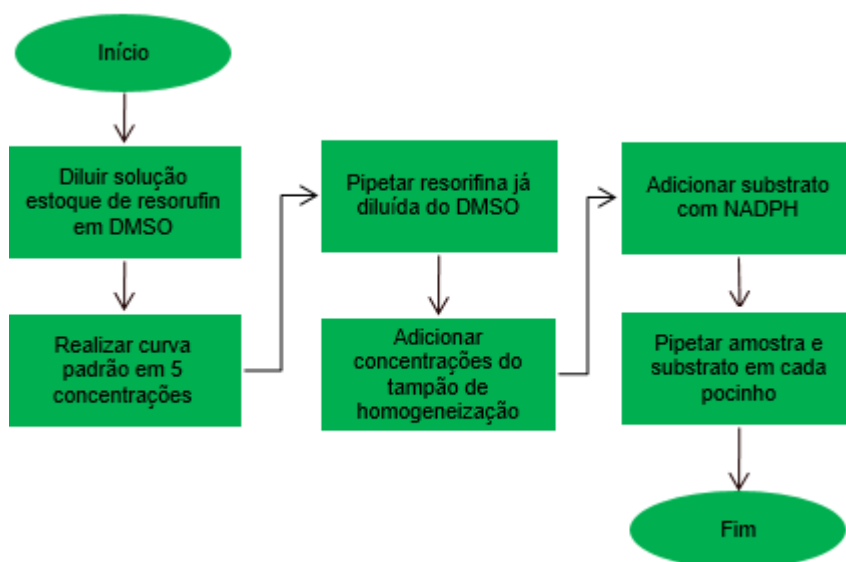


Figura 16. Preparação para leitura da curva de calibração - EROD

Para a realização da curva de calibração, foram diluídos 10 µL da solução estoque de resorufin em 9,990 mL de DMSO. Dentro de uma microplaca escura, foi realizada uma curva padrão com 5 diferentes concentrações: 0, 0,1; 0,015, 0,005; 0,10 nmol.mL<sup>-1</sup>. Em seguida, essas concentrações foram pipetadas com 0,2 µL, 5 µL, 10 µL e 20 µL da resorufina já diluída do DMSO. Em sequência, foram adicionados 50 µL, 48 µL, 45 µL, 40 µL e 30 µL do tampão de homogeneização. Foram colocados, com uma pipeta multicanal, 160 µL de substrato, além de 10 µL de NADPH, utilizando uma multipipetadora combipit (Tabela 03).

Tabela 03. Preparação da curva de calibração de EROD

Concentrações (nmol.mL <sup>-1</sup> )	Resorufina (µL)	Tampão homog. (µL)	Substrato (µL)	NADPH (µL)
0	0	50	160	10
0,1	2	48	160	10
0,15	5	45	160	10
0,005	10	40	160	10
0,19	20	30	160	10

### 2.2.15. Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi analisada nas brânquias e glândulas digestivas, em todos os exemplares, tempos e concentrações em estudo. Para a sua determinação foram realizados os ensaios, conforme adaptação de Mc Farland *et al.* (1999). Para este ensaio foi preparada uma solução tampão de fosfato de potássio com pH de 6,5 contendo 6,9672g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 350ml de água destilada (solução básica), misturada com 5,4436g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 350ml de água destilada (solução ácida). O meio de reação foi preparado com 0,0081g de 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) diluído em 1ml de etanol, adicionado com 0,0093g de GSH (glutathione reduzida).

Em seguida, foi adicionado 19 ml de tampão fosfato de potássio (0,1M à pH=6,5). Após a preparação das soluções, foram preparadas as microplacas transparentes para leitura, contendo 20 uL de cada amostra dos tecidos analisados, mais 20 uL para o branco com tampão de homogeneização, além de 180 ul do meio de reação. Com as microplacas devidamente preparadas, foram medidas

imediatamente em absorbância a 340 nm cada 30 segundos por 5 minutos. Resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína total.

#### **2.2.16. Glutathione Peroxidase (GPx)**

A atividade GPx foi avaliada nas brânquias e glândulas digestivas, em todos os exemplares, tempos e concentrações em estudo. Esta atividade foi determinada aplicando-se a metodologia descrita por Sies *et al.* (1979).

Para este ensaio foi preparado, primeiramente, o tampão fosfato de sódio, com pH 7,0 contendo 5,6784g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 350ml de água destilada (solução básica), acrescentada de 4,7992g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em 350ml de água destilada (solução ácida). Além da solução tampão, foi preparada também a solução peróxido de hidrogênio no escuro, contendo 26  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  em 10 ml de tampão fosfato de sódio, pipetando 1ml desta solução em 9 ml de tampão fosfato de sódio. Por fim, foi preparado o meio de reação com 0,019g azida sódica+0,025g NADPH+ 0,089g GSH+315 $\mu\text{l}$  de GR+101,15ml de tampão fosfato de sódio.

Com todas as soluções devidamente prontas, foram preparadas as microplacas transparentes para realização da leitura, contendo 20  $\mu\text{l}$  de amostra em duplicata, 20  $\mu\text{l}$  branco em duplicata (tampão de homogeneização), 140  $\mu\text{l}$  meio de reação, 40  $\mu\text{l}$  solução de peróxido de hidrogênio, medindo em equipamento a absorbância de 340 nm (tempo total de leitura medida=3min, com leituras a cada 1 min- cinética). Os resultados foram expressos em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína total.

#### **2.2.17. Glutathione reduzida (GSH)**

A atividade da GSH foi verificada nas brânquias e glândulas digestivas, em todos os exemplares, tempos e concentrações em estudo. Esta atividade foi determinada conforme o método de Sedlak & Lindsay (1968). Sendo baseado no na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB resultando em um produto que absorve luz a 415 nm.

Durante este experimento foi adicionado 50  $\mu\text{l}$  da solução de ácido tricloroacético a 50% aos 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante ainda congelado do tecido ([proteínas] > 5  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), sendo que para o branco, foi pipetado 50  $\mu\text{l}$  da solução de

ácido tricloroacético a 50% em 200 µl de PBS. Em seguida, a solução foi centrifugada a 5000 g por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, foram pipetados em microplacas transparentes em duplicatas: 50 µl do branco; 50 µl da curva-padrão; 50 µl do sobrenadante das amostras. Em todos os poços foram adicionados 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9; além de 20 µl de solução de DTNB. Foram aguardados, então entre 5-10 min a temperatura ambiente. Por fim, foi medida a absorbância a 415 nm.

### **2.2.18. Peroxidação lipídica (LPO)**

O ensaio para verificação da peroxidação lipídica foi realizado conforme Wills (1987), método do ácido tiobarbitúrico. Este ensaio foi realizado para os seguintes tecidos: brânquias, glândulas digestivas e hemolinfas. Para a realização deste experimento, foram preparadas as seguintes soluções: HCl 0,1M (1L) ultrapuro (temperatura ambiente); 3,64 ml de HCl em 996,36ml de água destilada; TMP (tetramethoxypropane) 0,001%, para realização da curva de calibração: Preparado em Falcon a dissolução de 0,1% de TMP em HCL 0,1M; 10µl TMP em 9,9ml de HCl 1mM, preparado em eppendorf 0,001% de TMP; 10µl da solução anterior em 990µl de água destilada; 1L de FeSO<sub>4</sub> ; 1mM; 0,279g de FeSO<sub>4</sub> em 1Litro de água destilada; 1litro de dissolução; 0,001mol/1litro de dissolução; 278,02g/1mol=0,278g de FeSO<sub>4</sub>; TCA (trichloroacetic acid) 10% em FeSO<sub>4</sub> 1mM (temperatura ambiente); 0,025g de TCA em 225ml FeSO<sub>4</sub>; TBA (thiobarbituric acid) 0,67% (escuro e temperatura ambiente) 1,675g TBA em 250ml de água destilada; 250g de água destilada; 0,67g de TBA/100gMQ=1,675gTBA.

Após a preparação das soluções acima, as amostras de brânquias, glândulas digestivas e hemolinfas, foram separadas em 150 ul de amostra homegeneizada, não centrifugada, com tampão para enzimas, iniciando, assim o ensaio, conforme os seguintes passos: realização de banho a 70°C; preparação da curva de calibração em eppendorfs de 1,5ml, conforme tabela a seguir.

Tabela 04: Curva de calibração LPO

Concentração $\mu\text{M}$	Vol TMP 0,001% ( $\mu\text{l}$ )	Água destilada ( $\mu\text{l}$ )
0 (branco)	0	150
0,6	6	144
1,5	15	135
3	30	120
4	40	110
6	60	90
10	100	50

A curva e amostras foram agitadas em vortex; pipetadas nos eppendorfs (300 $\mu\text{l}$  TCA 10%; 150 $\mu\text{l}$  TBA 0,67%; foram novamente agitadas em vortex; sendo então Incubadas por 10 minutos a 70°C, sendo que os pontos da curva também foram mantidos em banho maria até que se formaram em pellets. A seguir, foram preparadas as placas pretas para leitura, pipetando, em cada placa, 200 $\mu\text{l}$  de cada eppendorff em duplicata (amostras e curva). Sendo verificado, então, em equipamento, a fluorescência 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  TBARs/mg de proteínas.

### 2.2.19. Danos ao DNA mitocondrial (DNA strand breaks)

Os danos ao DNA mitocondrial foram avaliados por meio do ensaio adaptado de precipitação alcalina proposto por Olive (1988).

Primeiramente, foram preparadas as seguintes soluções: Solução de sódio dodecil sulfato (SDS 2%): preparado com 10mM de EDTA (PM=292,2 g/mol); 250ml dissolvido; 0,01/1000ml; 292,29/1 mol; 0,7305 g de EDTA; 10mm de Trizma base (PM=121,1 g/mol); 250ml dissolvido; 0,01mol/1000ml; 121,1g/1mol; 0,30275 g trizma base; 40mM de NaOH (PM=40 g/mol) 250ml; dissolvido em 0,04mol/1000ml; 40g/1mol=0,4g NaOH; Sodium dodecyl sulfate (SDS) 2%; 2g SDS para cada 100ml de dissolução---5g em 250ml. Solução de KCL 0,012M (temperatura ambiente): 50ml dissolvido; 0,12 moles/1000ml; 74,559/1mol= 0,447g KCl. Reagente Hoechst 1  $\mu\text{l}/\text{mL}$ : 0,4M NaCl, 4mM sodium choleate e 0,1 M tris-acetate com o pH de 8,5. Em cada pocinho fofo foram usados 150 $\mu\text{l}$  de reagente. A solução tampão foi preparada com 50ml

(ajustado o pH 8,5 com ácido acético): 0,4 M NaCl; 50ml de dissolvido; 0,4moles NaCl/1000ml;  $58,449/1\text{mol}=1,169\text{g}$  NaCl; 4mM sodium cholate (430,57g/mol); 50ml de dissolvido; 0,004moles/1000ml;  $430,579/1\text{mol}= 0,086\text{g}$ ; 0,1M de trizma-acetato 50ml de dissolvido\*  $0,1\text{mol}/1000\text{ml} * 121,149/1\text{mol} = 0,6057\text{g}$ . Foi preparado estoque do reagente Hoechst 1 mg/ml (geladeira e escuro): 100µl de hoescht 33342= trihydrochloride trihydrate (10mg/ml); 900ul de metanol. Foi preparada uma solução diária (reagente HOESCHST 1 µl/mL); (geladeira e escuro): 10 µl da solução acima (Stock do reagente n.2); 9,990 ml de Tampão n.1. O buffer de homogeneização foi preparado com solução TE1X: 10mM Trizma base-HCL (Pm= 121,19mol) em 500 ml 0,6055g; 1mM EDTA (PM= 380,2 g/mol) em 500ml 0,1901g; ph= 8. O standart de esperma de salmão foi preparado utilizado o estoque de esperma de 1mg/ml em 4°C; pesado 0,010g do estoque e diluido em 10 ml da TE1X; diluido no ultrassom. As amostras foram preparadas com 25 µl de amostra homogeneizada não centrifugada com tampão de enzimas.

Após a preparação das soluções acima foram realizados os ensaios, seguindo o seguinte procedimento: agitados os eppendorffs com 25µl de amostras homogeneizadas (agitar primeiro); adicionados 200 µl SDS 20% aos eppendorffs com amostra; Agitados por inversão 2 vezes; deixados em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto; adicionados 200 µl KCl 0,12m; agitados por inversão 2 vezes; aquecidos a 60°C por 10 minutos; agitados por inversão 2 vezes; incubados 30 min a 4°C; centrifugados a 8000g por 5 minutos, 4°C (6800 rpm). As amostras foram pipetadas em placa preta, em duplicata com 50 µl do sobrenadante; adicionado 150 µl do reativo Hoechst (solução diária 1ul/mL).

Tabela 05: Curva de calibração danos ao DNA.

<b>Standart µg/ml</b>	<b>Standart de esperma de salmão µl</b>	<b>Buffer de homogeneização µl</b>	<b>Reativo Hoechst µl solução diária</b>
0 (Branco)	0	50	150
4,55	5	49,50	150
9,1	10	49	150
22,7	25	47,5	150
45,5	50	45	150
90,9	100	40	150
113,6	125	37,5	150

Leitura: Agitada a placa durante 5 minutos (300s) a 700rpm; medindo a fluorescência; excitação:360nm; emissão 460 nm; manual 60; shaking 300 seg; orbital; intensity low.

### **2.2.20. Colinesterase (ChE)**

A atividade ChE foi verificada no músculo e hemolinfa, em todos os exemplares, tempos e concentrações em estudo. Esta atividade foi determinada conforme adaptação ao método descrito por Ellman (1961).

Para este ensaio foi preparado, primeiramente, o tampão fosfato de sódio, com pH 7,5 contendo 6,9672g  $K_2HPO_4$  em 400 ml de água destilada (solução básica), acrescentada de 5,4436g  $KH_2PO_4$  em 400 ml de água destilada (solução ácida). Além da solução tampão, foi preparada também uma solução com 0,0042g de DTNB diluído em 500ul de metanol (Eppendorf). Após diluído, foi adicionado 13,4 ml de tampão fosfato de potássio (0,1M, pH =7,5). Uma terceira solução também foi preparada com 0,0161g iodeto de acetilcolina e 6ml tampão fosfato de potássio. Com todas as soluções devidamente prontas, foram preparadas as microplacas transparentes para realização da leitura, contendo 20 $\mu$ l de amostra em duplicata, 20 $\mu$ l branco em duplicata (tampão de homogeneização), 140  $\mu$ l da solução com DTNB e 50 da solução com iodeto de acetilcolina, medindo em equipamento a absorbância de 340 nm (tempo total de leitura medida=3min, com leituras a cada 1 min- cinética). Os resultados foram expressos em nmol DTNB.min<sup>-1</sup>.mg proteína total<sup>-1</sup>.

### **2.2.21. Biometria**

Os dados biométricos foram obtidos por meio de paquímetros para medir a largura e comprimento de cada indivíduo, bem como, uma balança de alta precisão para realização das pesagens de cada ostra do experimento.

Em cada dia de extração, T0; T2; T4 e T7 dia, o procedimento de medir e pesar foi realizado antes da abertura do animal. Sendo realizada também a pesagem das conchas vazias, após a extração, com a finalidade de comparação do antes e depois.

### **2.2.22. Mortalidade**

Todos os dias foi verificado se continha algum indivíduo morto e quando constatada a morte de alguma ostra durante os experimentos, foi realizada a contagem e anotações do dia da morte a fim de verificar as concentrações responsáveis pelo maior número de indivíduos vindo a óbito.

### **2.2.23. Resposta Integrada de Biomarcadores - IBR**

A resposta integrada de biomarcadores, proposto por Mattos *et al.*, (2024), assim como por Devin *et al.* (2014), Liu *et. al* (2013) e Beliaeff e Burgeot (2002), com o propósito descrever o estado geral ecotoxicológico do organismo. De acordo com Caliani *et al* (2021), com os cálculos do índice IBR é possível descrever a saúde global do organismo.

Para obtenção dos dados IBR, os valores de cada biomarcador foi normalizado realizando a subtração do valor médio dos indivíduos, dividindo pelo desvio padrão de cada um. Com a normalização dos resultados de cada biomarcador, foram realizadas a soma do valor mínimo de cada biomarcador (pontuação Z). Após isso, foram calculados os índices, bem como a média de cada valor Z dos biomarcadores. Foram realizadas, então, comparações múltiplas de todas as concentrações de exposição com o grupo de controle, conforme o método Dunnett.

### **2.2.24. Danos histológicos**

#### **Extração dos tecidos**

Após a extração dos tecidos das ostras, os exemplares separados foram encaminhados para a extração do teste histológico, sendo retiradas as brânquias e colocadas em cassetes histológicos para posterior análise de efeitos.

## Morfometria

Após a extração dos tecidos das ostras, foram separados exemplares para o teste morfométricos. Partes das brânquias foram colocadas em cassetes histológicos para posterior análise. As amostras destinadas às análises histológicas foram fixadas em solução ALFAC (álcool, formaldeído e ácido acético) por 16 horas e, em seguida, armazenadas em álcool 70%.

O processamento histológico foi realizado seguindo os procedimentos padrão, que consistem em três etapas: desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Após a inclusão, foram obtidos cinco cortes semisseriados de brânquias com espessura de 5  $\mu\text{m}$  e espaçamento de 20  $\mu\text{m}$ . Esses cortes passaram por nova diafanização, hidratação e, finalmente, foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), possibilitando a visualização das estruturas.

A análise morfométrica das brânquias foi realizada utilizando método adaptado de Nero *et al.* (2006) e aplicado por Marinsek (2018). Foi delimitado três plicas para as medições, sendo a primeira plica do corte, a do meio e a última.

Foram então capturadas três fotomicrografias (100x) por corte, totalizando 15 fotomicrografias por indivíduo. A partir das fotomicrografias, foi mensurado o comprimento dos filamentos (CF), a largura (LF) e distância (DI) entre os filamentos sendo que para os parâmetros LF e DI foram realizadas três medidas representando as porções basal, medial e apical, obtendo-se uma média dos resultados.

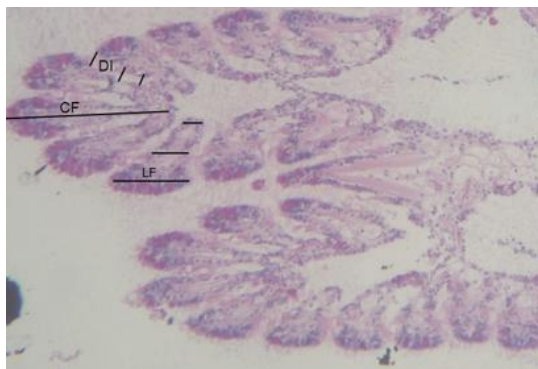


Figura 17. Fotomicrografia (100x) mostrando o corte da brânquia (DI: Distância; CF: Comprimento dos filamentos; LF: Largura).

### **2.2.25. Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas, primeiramente os dados foram analisados por meio do teste de Grubbs para remoção dos outliers, posteriormente foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett's, sendo realizada, então uma análise de variância (ANOVA), com teste a posteriori de Dunnett, comparando o controle em relação às concentrações no seu respectivo tempo. O nível de significância utilizado em todas as análises foi  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

As concentrações reais foram em média 85% das concentrações nominais e, portanto, os resultados serão apresentados com base nas concentrações nominais. Entretanto, as concentrações finais (após 24 horas de exposição) foram reduzidas em média 94% na água, o que pode ser devido à degradação ou absorção do MDMA pelos organismos.

#### **3.1. Mortalidade**

Durante o ensaio foram constatadas 15 mortes, correspondendo a 11% do total de 133 ostras amostradas, onde mais de 60% das morreram no segundo dia de exposição. Além disso, 80% das mortes foram constatadas nos tratamentos com concentrações do contaminante, enquanto que em 20% das mortes foram constatadas no tratamento de controle.

#### **3.2. Resultados dos biomarcadores**

Os resultados serão demonstrados em ordem de tecido e possível metabolismo do contaminante, onde a fase 01 de biotransformação (será representada através do biomarcador EROD; já, a fase 02 (conjugação com glutathione e aminoácidos) será representada pela GST; o sistema antioxidante será demonstrado pela GPx e GSH. Além do metabolismo, serão apresentados também os efeitos subletais do MDMA relacionados a LPO; danos em DNA; atividade de CHE; e estabilidade da membrana lisossomal.

### 3.2.1. Brânquias:

Nas brânquias foram investigados os efeitos do MDMA nas concentrações de estudo durante 7 dias, durante as fases 1 e 2 do processo de biotransformação e conjugação, EROD e GST respectivamente, bem como o sistema antioxidante (GPx; GSH), e os danos em de LPO e DNA (Figura X).

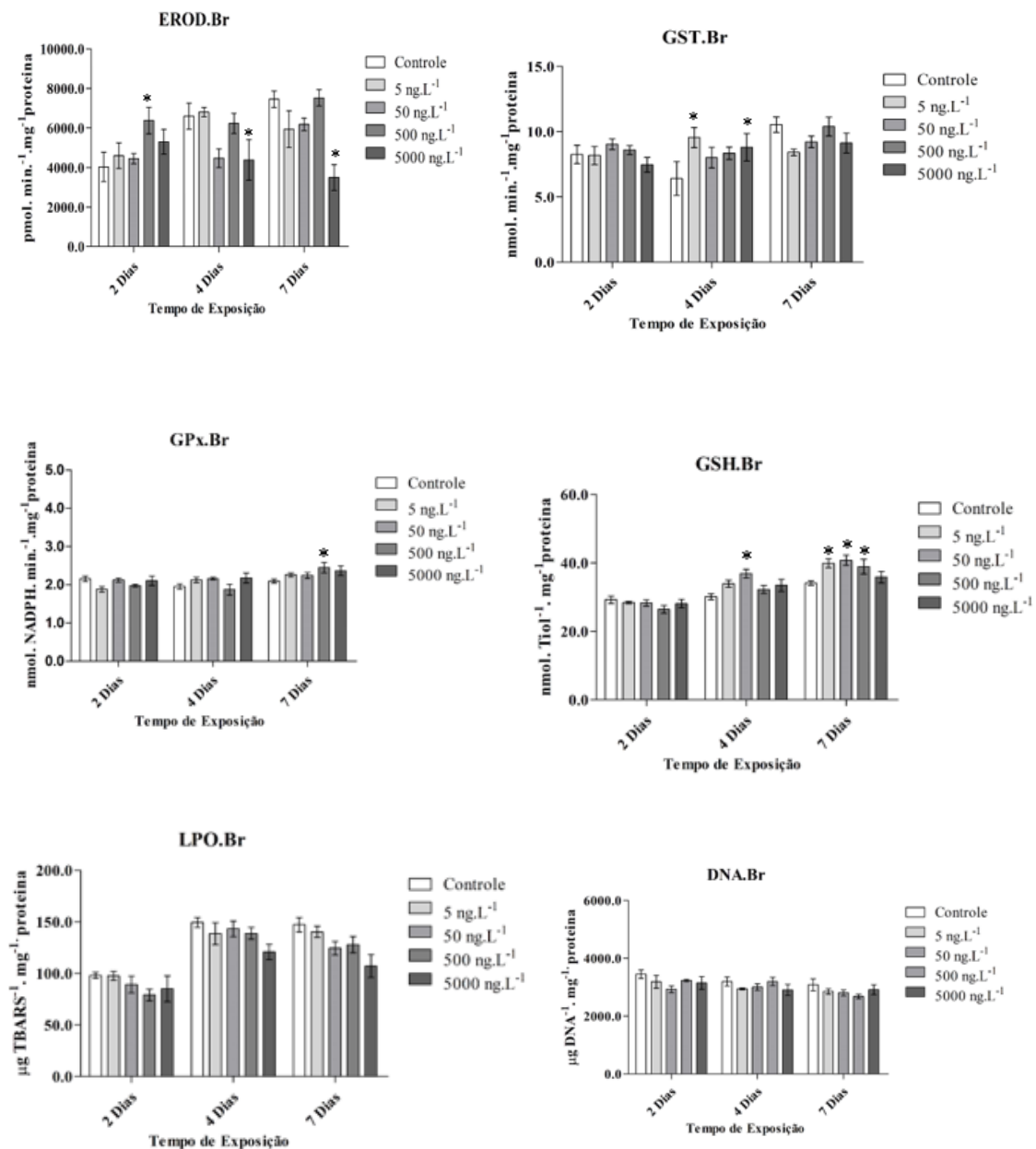


Figura 18: Média e erro padrão de EROD; GST; GPx; GSH; LPO; atividade de DNA nas brânquias de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5 ng. L<sup>-1</sup>, 50 ng. L<sup>-1</sup>, 500 ng. L<sup>-1</sup>, 5000 ng. L<sup>-1</sup>) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). \* indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo (p < 0,05).

Os resultados da atividade enzimática de EROD demonstram um aumento significativo em comparação ao controle após 48 horas de exposição a uma concentração de 500 ng/L<sup>-1</sup>. No entanto, após 96 horas de exposição, foi observada uma redução na atividade de EROD em comparação ao controle no tratamento com 5000 ng/L<sup>-1</sup>. Esta inibição na atividade continuou a ser observada após 168 horas de exposição à concentração de 5000 ng/L<sup>-1</sup>.

Neste estudo, observou-se que a atividade de GST nas brânquias teve um aumento significativo em comparação ao controle na concentração ambiental de 5 ng.L<sup>-1</sup> e também na maior concentração de 5000 ng.L<sup>-1</sup> após 96 horas de exposição. Esse aumento na fase II do processo de biotransformação pode ser uma resposta aos ajustes enzimáticos devido à diminuição da atividade de EROD (fase I).

O sistema antioxidante, medido pela atividade de GPx nas brânquias, mostrou um aumento significativo após 168 horas de exposição a uma concentração de 500 ng/L<sup>-1</sup>. A quantificação de GSH demonstrou um aumento significativo após 96 horas de exposição a 50 ng.L<sup>-1</sup>. Após 168 horas de exposição, as seguintes concentrações foram estatisticamente diferentes do controle: 5, 50 e 500 ng.L<sup>-1</sup>.

A peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias, avaliada neste estudo, não apresentou variações significativas que indicassem quaisquer efeitos deletérios nas membranas celulares. Neste estudo, observou-se que o MDMA não causou danos significativos ao DNA das brânquias, tanto em termos de interação tempo versus tratamento quanto em relação às concentrações e dias de exposição ao contaminante. Isso se deve ao fato de que, durante toda a exposição, as quebras de fita de DNA em todos os tratamentos contendo concentrações do contaminante foram menores do que no controle.

Após avaliar os processos de biotransformação e conjugação, efeitos oxidativos e danos às estruturas das brânquias, constatou-se que o MDMA pode inibir o sistema de biotransformação (fase 01), conforme medido pela EROD, com a inibição dessa atividade observada após 96 e 168 horas de exposição à maior concentração de 5000 ng/L<sup>-1</sup>. No entanto, apesar dessa inibição, a fase 02 (conjugação), indicada pela glutathione-S-transferase (GST), foi induzida após 96 horas de exposição à concentração ambiental de 5 ng/L<sup>-1</sup>. Esta resposta também foi observada com um aumento na atividade do sistema antioxidante, especialmente com o aumento da atividade da glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione reduzida (GSH) em

comparação ao controle. Esse aumento de GST, GPx e GSH mostrou-se eficaz na prevenção de danos oxidativos, pois não foram observadas peroxidação lipídica ou danos primários ao DNA. Portanto, não foram observados danos oxidativos significativos nas brânquias de *Crassostrea gasar* expostas ao MDMA.

### 3.2.2. Glândula Digestiva

Na glândula digestiva, os efeitos do MDMA nas concentrações do estudo foram investigados durante 7 dias, com foco na fase 2 (conjugação - GST), bem como no sistema antioxidante (GPx; GSH) e nos efeitos oxidativos (LPO) e danos ao DNA (Figura 20).

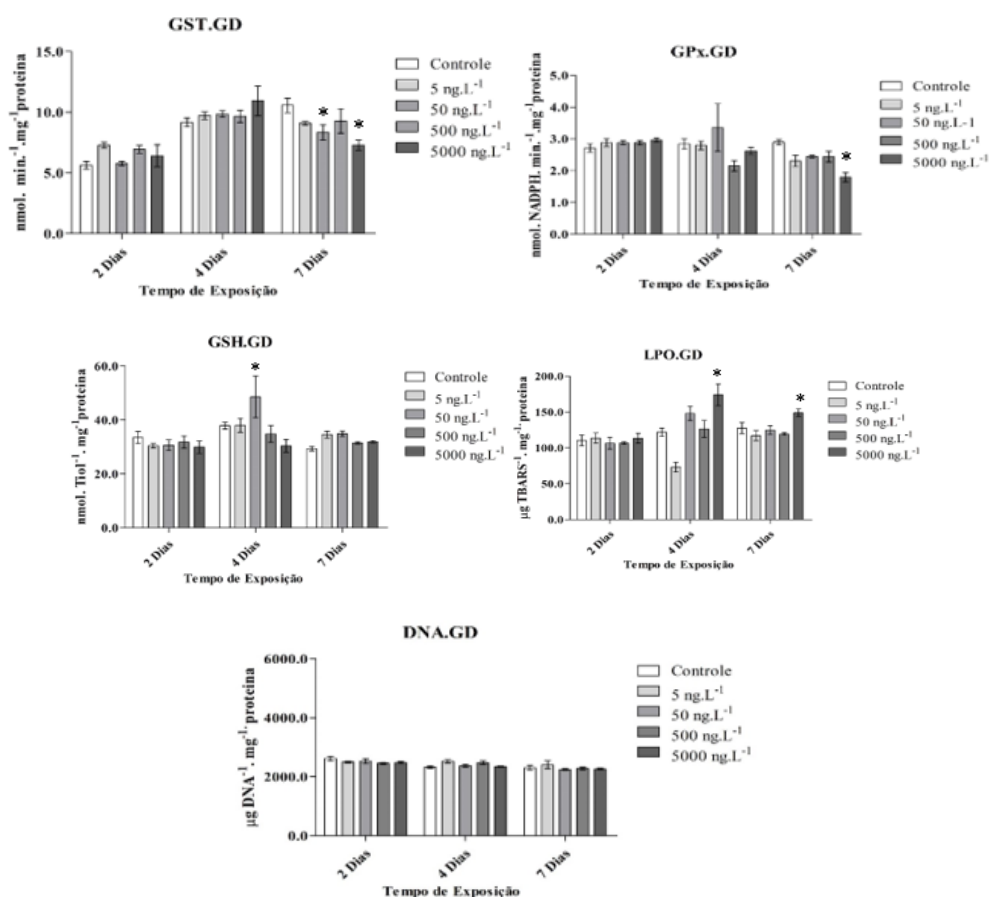


Figura 19. Média e erro padrão de GST; GPx; GSH; LPO; atividade de DNA nas glândulas digestivas de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L<sup>-1</sup>) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). \* indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo (p < 0,05).

Durante a fase 2, ou seja, o processo de conjugação medido pela atividade de GST nas glândulas digestivas, foi observada uma inibição da atividade após 168 horas nos tratamentos de 50 e 5000 ng/L<sup>-1</sup>. No sistema antioxidante, medido pela atividade de GPx nas glândulas digestivas, foi observada uma diminuição na sua atividade após 168 horas de exposição a uma concentração de 5000 ng/L<sup>-1</sup>, indicando um efeito inibitório em concentrações mais altas e tempos de exposição mais longos. Ainda na análise do sistema antioxidante, agora medido pelo GSH, foi observado um aumento significativo após 96 horas a 50 ng/L<sup>-1</sup>. Após 168 horas, houve uma tendência de aumento no GSH. Foi observado um aumento significativo na peroxidação lipídica nas glândulas digestivas após 96 e 168 horas de exposição a 5000 ng/L<sup>-1</sup>. Não foram observados danos significativos nas fitas de DNA das glândulas digestivas.

Após avaliar os processos de biotransformação e conjugação, sistemas antioxidantes e efeitos oxidativos nas glândulas digestivas, constatou-se que o maior impacto do MDMA nesse tecido estava relacionado à inibição das atividades das enzimas GST e GPx, ambas com funções antioxidantes, levando à peroxidação lipídica observada aos 4 e 7 dias de exposição a 5000 ng/L<sup>-1</sup>. Portanto, as glândulas digestivas de *C. gasar* expostas ao MDMA mostraram maiores efeitos subletais em comparação com as brânquias.

### 3.2.3. Hemolinfa

Os resultados dos biomarcadores na hemolinfa estão apresentados na Figura X.

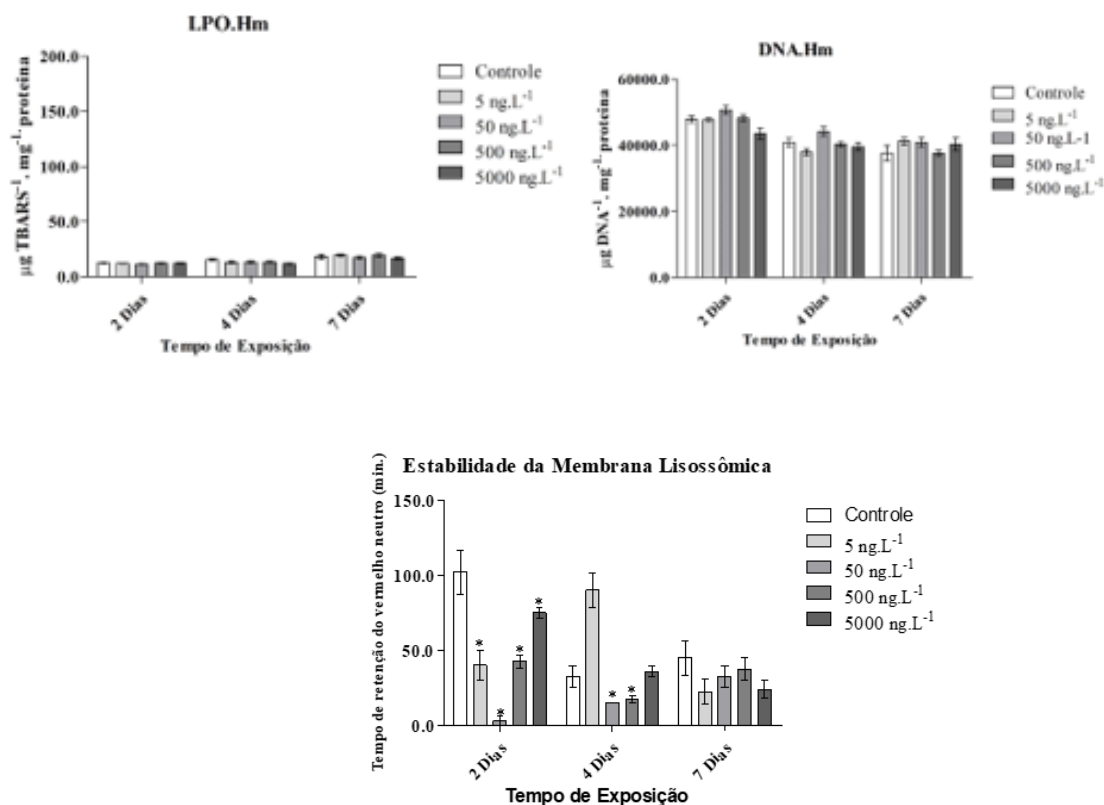


Figura 20. Média e erro padrão de LPO; DNA; LMS na hemolinfa de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500, 5000 ng/L<sup>-1</sup>) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). \* indica diferença significativa entre a concentração e o grupo controle no respectivo tempo ( $p < 0,05$ ).

Neste experimento, não foram constatadas peroxidação lipídica nas membranas celulares da hemolinfa, de maneira significativa. Do mesmo modo, não foram evidenciadas quebras significativas nas fitas de DNA causadas pelo MDMA na hemolinfa, comparando as concentrações do estudo ao controle, durante os sete dias de exposição. Para observar as alterações na permeabilidade lisossomal dos hemócitos de ostras, foram realizados estudos sobre os danos causados pela exposição ao MDMA. Assim, durante os ensaios de TRCVN, foi observado que efeitos significativos ocorreram a partir da menor concentração de MDMA (5 ng/L<sup>-1</sup>) em T2.

### 3.2.4. Músculo

No músculo adutor das ostras, foram verificados efeitos deletérios na neurotransmissão colinérgica por meio da mensuração da atividade da colinesterase, visando identificar prejuízos na transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas (Figura X).

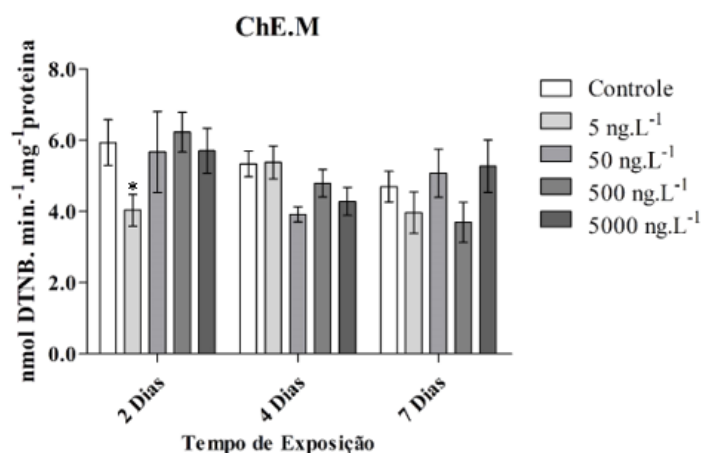


Figura 21. Média e erro padrão da atividade de ChE no músculo adutor de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L<sup>-1</sup>) e tempos de exposição (2, 4 e 7 dias). \*representa diferença significativa entre o grupo concentração e controle nos respectivos tempos ( $p < 0,05$ ).

No presente estudo, foi observada inibição da atividade da colinesterase (ChE) na concentração ambiental de 5 ng.L<sup>-1</sup> após 48 horas de exposição.

### 3.2.5. Índice IBR

Com a integração dos biomarcadores, foi constatado que quanto maiores as concentrações de exposição ao MDMA, maiores as respostas de efeito observados, conforme análises a seguir.

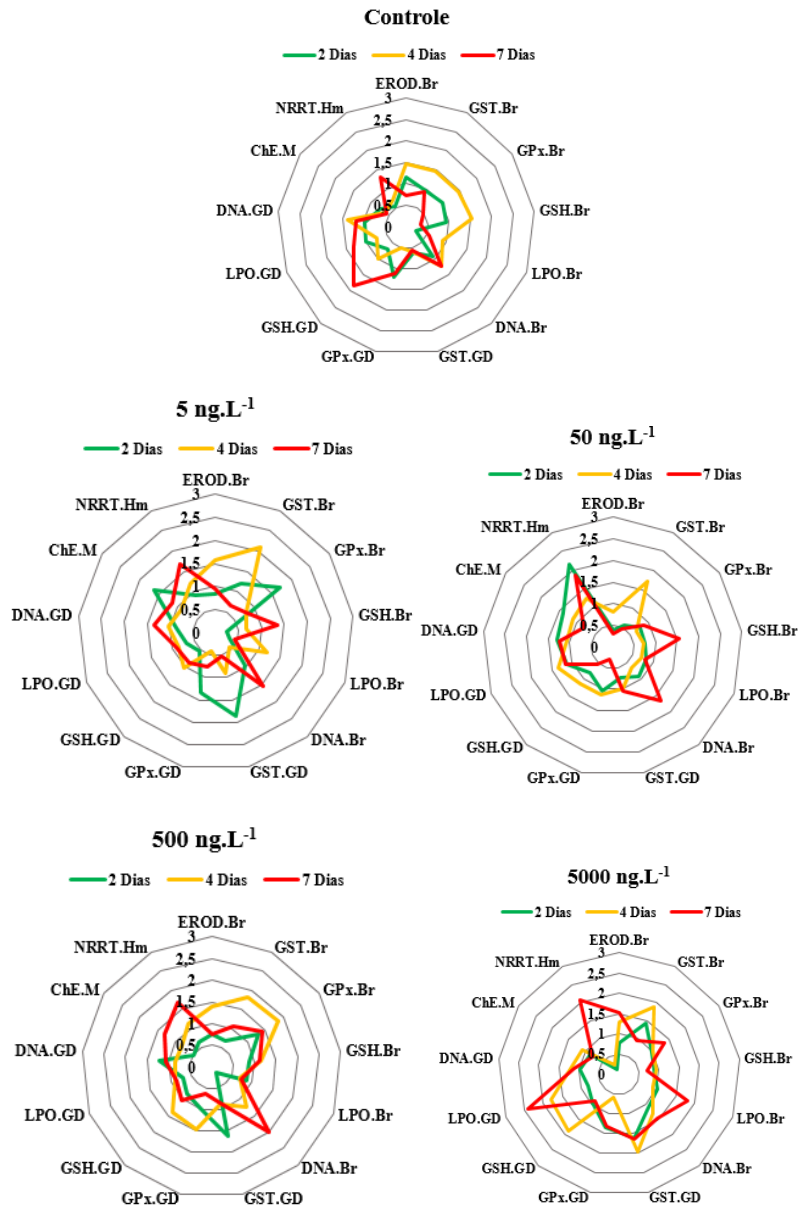


Figura 22. Índice integrado de respostas dos biomarcadores mensurados nas brânquias, glândulas digestivas e hemolinfa de *Crassostrea gasar* exposta ao MDMA, em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Os gráficos demonstram uma integração de todos os biomarcadores testados em cada tecido, evidenciando os efeitos causados em *C. gasar* expostas às diversas concentrações de MDMA ao longo de 7 dias de exposição, onde o contaminante em questão proporcionou um estresse oxidativo e danos celulares significativos aos bivalves em estudo.

Diferenças significativas foram observadas entre os índices dos diferentes tratamentos, conforme Tabela 06.

Tabela 06. IBR dos diferentes tratamentos e tempos de exposição

	<b>2 Days</b>	<b>4 Days</b>	<b>7 Days</b>	$\bar{X}$	$\Sigma$	<b>p</b>
<b>Control</b>	9,62	7,71	8,54	8,62	25,87	
<b>[5 ng.L<sup>-1</sup>]</b>	13,22	12,27	13,07	12,85	38,56	<b>0,05</b>
<b>[50 ng.L<sup>-1</sup>]</b>	12,72	14,28	12,63	13,21	39,63	<b>0,04</b>
<b>[500 ng.L<sup>-1</sup>]</b>	11,31	16,49	14,57	14,13	42,38	<b>0,01</b>
<b>[5000 ng.L<sup>-1</sup>]</b>	12,90	16,87	18,24	16,00	48,01	<b>0,002</b>

### 3.2.6. Análises histológicas

A fim de compreender melhor os danos histológicos ocasionados ao bivalve pelo MDMA, foram analisados os resultados nas alterações morfológicas das brânquias após 7 dias de exposição. Para a realização das análises dos resultados, serão apresentados os gráficos organizados por tecido e tempo, após testes estatísticos ANOVA e teste a posteriori. A seguir são mostrados os resultados morfométricos das brânquias de *Crassostrea gasar* exposta às concentrações de MDMA após 07 dias de exposição.

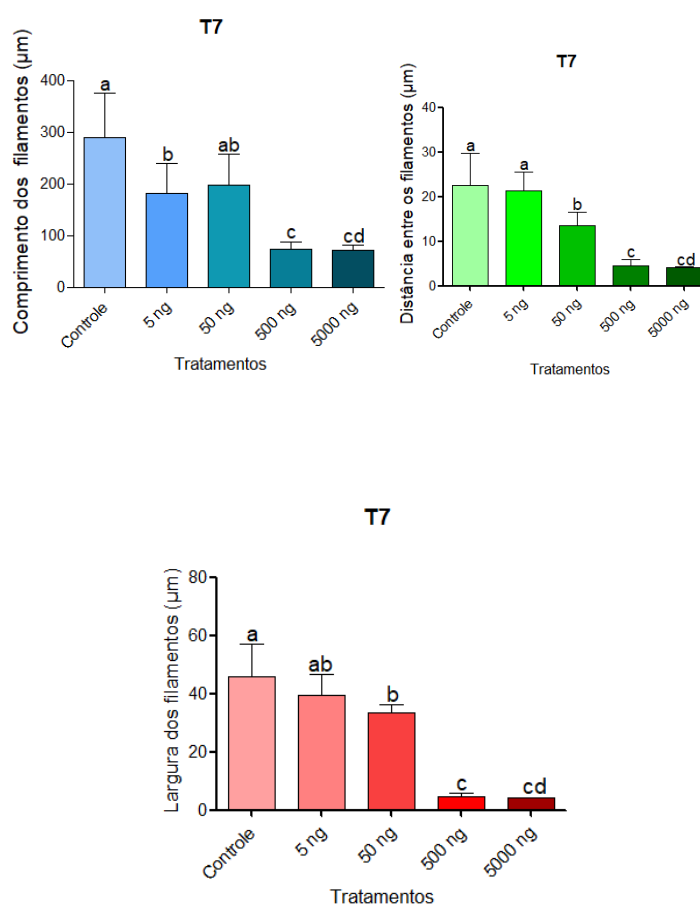


Figura 23: Média e erro padrão do comprimento das lamelas, distância interlamelar, largura das lamelas nas brânquias de *Crassostrea gasar* em diferentes concentrações (5, 50, 500 e 5000 ng.L<sup>-1</sup>) após 7 dias de exposição. a (p < 0,05). As letras acima de cada barra (a,b,c,d,e) indicam as semelhanças ou diferenças entre cada tratamento, com base nos resultados do teste a posteriori.

De acordo com o que foi verificado nos gráficos acima, após sete dias de exposição ao MDMA, o bivalve *Crassostrea gasar* mostrou que o comprimento das lamelas, a distância interlamelar e a largura das lamelas diminuem conforme o aumento das concentrações do contaminante, conforme se observa nos tratamentos com maiores concentrações de 500 ng.L<sup>-1</sup> e 5000 ng.L<sup>-1</sup>, indicando que o MDMA provoca alterações funcionais nas estruturas lamelares branquiais.

#### 4. DISCUSSÃO

Foram evidenciadas concentrações ambientais de MDMA em diversos corpos aquáticos pelo mundo. Concentrações superiores a 27.000 ng.L<sup>-1</sup> de MDMA foram detectadas em entradas de efluentes domésticos em uma estação de tratamento de efluentes localizada na província de Castellón, região de Valência (Espanha) após um festival de música realizada aos arredores da região (Bijlsma *et al.*, 2014). Zhao e colaboradores (2023) detectaram, em estações de tratamento de águas residuais em Xinjiang, China, entre outras drogas ilícitas, concentrações de MDMA entre 0,44 a 8,52 ng.L<sup>-1</sup>. Por sua vez, Verovšek *et al.* (2023) detectaram substâncias psicoativas também em estações de tratamento de águas residuais na Eslovênia, entre estas substâncias, foi encontrado 218 ng.L<sup>-1</sup> de MDMA. Sims *et al.* (2024) também detectaram, além de outras drogas ilícitas psicoativas, MDMA após festivais de música em Las Vegas – EUA, nas concentrações entre 13,7 a 194 ng.L<sup>-1</sup>.

Neste estudo, foram analisadas as brânquias quanto à atividade EROD. Foi realizada uma comparação dos efeitos do MDMA com os de outros contaminantes com manifestações metabólicas semelhantes, como cocaína/benzoilecgonina, crack e fluoxetina. Esses compostos têm sintomas psicoativos similares ao MDMA. Ortega *et al.* (2019) observaram um aumento significativo na atividade EROD após 96 horas de exposição a uma concentração de 50.000 ng.L<sup>-1</sup> de crack nas brânquias de *Perna perna*. Cortez *et al.* (2019), também expondo as brânquias de *P. perna*, observaram que EROD foi significativamente ativada após 48 horas de exposição à fluoxetina na maior concentração testada (300 ng.L<sup>-1</sup>). No entanto, essas outras substâncias (cocaína/benzoilecgonina, crack e fluoxetina) parecem causar um efeito diferente na atividade EROD em comparação com o observado pelo MDMA em *C. gasar*.

Em humanos, o citocromo CYP2D6 é a principal enzima responsável pela degradação metabólica do MDMA no fígado, regulando a O-desmetilação do MDMA e causando sua inibição (De La Torre *et al.*, 2012; Henríquez-Hernández *et al.*, 2023; Lugo *et al.*, 2022; Vizeli *et al.*, 2017). Durante o metabolismo, o MDMA é biotransformado em seus principais metabolitos da fase 01 (oxidação, redução e hidrólise): MDA, 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA); 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA), bem como seus metabolitos intermediários: 3,4-diidroxi-anfetamina (HHA) e 3,4-diidroxi-metanfetamina (HHMA) (Faro *et al.*, 2024).

De acordo com Faro *et al.* (2024), durante o processo de metabolismo do MDMA no corpo humano, o composto sofre N-desalquilação, com a remoção de um grupo alquila, e é então transformado em MDA, que é conjugado a um grupo sulfato, transformando-se em HHMA e, em seguida, sofre glucuronidação, transformando-se em HMA. Ao mesmo tempo, o MDMA sofre O-desmetilação, removendo um grupo metileno (CH<sub>2</sub>), criando o composto HHMA, que depois sofre O-metilação, adicionando um grupo metil (CH<sub>3</sub>) a um átomo de oxigênio (O<sub>2</sub>), transformando-se em HMMA e depois modificado para HMA, aumentando a solubilidade do composto e facilitando sua excreção.

Capela e Carvalho (2022) relataram que, em camundongos, os efeitos do MDMA nas mitocôndrias do cérebro ou do fígado resultaram em níveis reduzidos de ATP e inibição dos complexos mitocondriais I e III, além da perda do potencial da membrana mitocondrial e indução da abertura dos poros na membrana, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial. O envolvimento das mitocôndrias na morte celular programada induzida por MDMA também foi confirmado, incluindo a liberação de citocromo P450. Além disso, tanto o MDMA quanto seus metabólitos interferiram no fluxo mitocondrial normal e aumentaram a degradação mitocondrial nos axônios. Os autores também relataram que, em animais, o MDMA reduziu a atividade do complexo mitocondrial I e os níveis de ATP. Além disso, o estresse oxidativo induzido pelo MDMA foi associado à degradação do DNA mitocondrial e à interferência na produção de proteínas mitocondriais.

Em estudos com ratos, Carmo *et al.* (2006) administraram doses de MDMA, onde a expressão de CYP2D61 foi observada, mostrando efeitos citotóxicos por meio dessa enzima. No entanto, em um estudo conduzido em camundongos com administração de MDMA, Nilchi *et al.* (2022) relataram que a atividade de CYP2E1 diminuiu após a administração da droga na dose letal de 600 ng/ml.

Sobre a fase II, De Felice *et al.* (2023) observaram que a atividade de GST em *Daphnia magna* exposta a 50 e 500 ng.L<sup>-1</sup> de MDMA por 7 dias foi menor em comparação com os indivíduos do grupo controle, resultado semelhante ao encontrado por Trombini e colaboradores (2019), os quais analisaram os efeitos no molusco marinho *Ruditapes philippinarum* expostos a medicamentos, entre eles o carbamazepine (CBZ) (com efeitos domaminérgicos semelhantes ao MDMA), durante 14 dias, em uma concentração equivalente a 15.000 ng.L<sup>-1</sup>, onde foi observada uma

diminuição da atividade GST após 24 horas de exposição, porém com um aumento após 22 dias. Estes resultados diferem do que foi observado em *C. gasar* exposta ao mesmo contaminante. No entanto, semelhante ao que foi observado em *C. gasar* exposta ao MDMA, Ortega *et al.* (2019) observaram um aumento na atividade de GST nas brânquias de *Perna perna* após 48 e 168 horas de exposição a crack nas concentrações de 5000 e 50000 ng.L<sup>-1</sup>. De forma semelhante, Cortez *et al.* (2019) detectaram um aumento na atividade de GST após 48 e 96 horas de exposição a 3 e 30 ng.L<sup>-1</sup> de fluoxetina em *P. perna*. Da mesma forma, Parolini *et al.* (2018), ao expor *Daphnia magna*, detectaram um aumento na atividade de GST após 48 horas de exposição a 500 e 1000 ng.L<sup>-1</sup> de benzoylecgonina (BE). De Felice *et al.* (2019), expondo *Daphnia magna* a concentrações de cocaína, também observaram um aumento na atividade de GST nas concentrações de 50 e 500 ng.L<sup>-1</sup> após 7 dias do ensaio. Rafiq e colaboradores (2023) realizaram um estudo em *Mytilus galloprovincialis*, expondo o molusco bivalve, durante 07 dias, a concentrações ambientais (0,5; 5 e 10 ng.L<sup>-1</sup>) de antidepressivos, tais como, fluoxetina, sertralina e citalopram, relacionados à inibidores seletivos da recaptação de serotonina, bem como, venlafaxina, relacionada aos inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina, a fim de avaliar, entre outros efeitos, os resultados dos biomarcadores tais como a estabilidade da membrana lisossomal, GST e AChE. Foi detectado neste estudo um aumento na atividade GST nas brânquias em comparação ao controle, nas concentrações 5 ng.L<sup>-1</sup> de sertralina (concentração semelhante ao atual estudo com MDMA) e 10 ng.L<sup>-1</sup>.

Portanto, com base em outros estudos com drogas psicoativas, a fase II do processo de biotransformação, por meio da conjugação com glutatona (GST), foi aumentada nas brânquias.

No sistema antioxidante, corroborando com os resultados da pesquisa atual, Ortega *et al.* (2019) também detectaram que a atividade de GPx medida nas brânquias de *Perna perna* aumentou significativamente após 48 horas de exposição a solução de crack a 5000 ng.L<sup>-1</sup>. Da mesma forma, De Felice *et al.* (2019) observaram um aumento na atividade de GPx nas concentrações de 50 e 500 ng.L<sup>-1</sup> após um ensaio de 7 dias com cocaína em *Daphnia magna*. Em outro ensaio, De Felice *et al.* (2020) expuseram *Mytilus galloprovincialis* a concentrações de uma mistura de cocaína e benzoylecgonina, onde encontraram ativação da atividade de GPx após 2 dias e

inibição dessa enzima após 4 dias em todas as concentrações estudadas: 500 ng.L<sup>-1</sup> de cocaína; 20 ng.L<sup>-1</sup> de cocaína; mistura de 20 ng.L<sup>-1</sup> de cocaína com benzoilecgonina.

O aumento na resposta de GSH diante de níveis reduzidos de GPx pode indicar uma resposta compensatória do organismo ao estresse oxidativo e uma tentativa de desintoxicar o contaminante. Não foram encontrados na literatura efeitos relacionados ao GSH nas brânquias de organismos aquáticos expostos a substâncias psicoativas.

A peroxidação lipídica observada nas brânquias neste estudo apresentou o mesmo resultado obtido por Ortega *et al.* (2019), que também não observaram diferença significativa na peroxidação lipídica nas brânquias de *P. perna* expostas a crack. No entanto, para Cortez *et al.* (2019), a exposição à fluoxetina em *Perna perna* causou efeitos oxidativos avaliados por peroxidação lipídica após 96 horas de exposição à concentração de 300 ng.L<sup>-1</sup>. O mesmo ocorreu no estudo conduzido por Parolini *et al.* (2018), onde foi observado um aumento na peroxidação lipídica, duas vezes maior do que o controle, após 48 horas de exposição a 1000 ng.L<sup>-1</sup> de benzoilecgonina (BE) em *Daphnia magna*. Trombini e colaboradores (2019) também identificaram aumento significativo nos níveis de LPO após 22 dias de exposição de *Ruditapes philippinarum* expostos ao carbamazepine.

Sobre os resultados de DNA, ao contrário do observado em *C. gasar* exposta ao MDMA, outros estudos detectaram resultados opostos. Por exemplo, Ortega *et al.* (2019) observaram que o crack causou danos genéticos primários significativamente maiores ao DNA das brânquias de *P. perna*, com um aumento nas quebras de fita após 96 horas de exposição à concentração de 5000 ng.L<sup>-1</sup>. Da mesma forma, Cortez *et al.* (2019) detectaram danos ao DNA em *P. perna* após 96 horas de exposição à maior concentração de fluoxetina (300 ng.L<sup>-1</sup>). Igualmente, Parolini *et al.* (2016) expuseram mexilhões zebra a misturas contendo cocaína (50 ng.L<sup>-1</sup>), benzoilecgonina (300 ng.L<sup>-1</sup>), anfetamina (300 ng.L<sup>-1</sup>), morfina (100 ng.L<sup>-1</sup>) e 3,4-metilenodioximetanfetamina (50 ng.L<sup>-1</sup>) por 14 dias. Neste estudo, foi observado um aumento significativo na fragmentação do DNA a partir do décimo primeiro dia de exposição, atingindo valores 3 vezes maiores que os controles ao final do experimento.

Sobre as glândulas digestivas, a inibição da GST pode ser um efeito negativo na resposta do organismo ao contaminante, potencialmente causando danos deletérios ao animal exposto em concentrações mais altas ao longo do tempo. Ortega *et al.* (2019) também observaram uma diminuição significativa nesta atividade nas glândulas digestivas após 96 horas de exposição à maior concentração testada (50000 ng.L<sup>-1</sup>). No entanto, Cortez *et al.* (2019) observaram um aumento na atividade de GST na glândula digestiva de *P. perna* quando exposta a concentrações de 3 ng.L<sup>-1</sup> de fluoxetina após 96 horas, bem como concentrações de 30 ng.L<sup>-1</sup> após 48 horas. Trombini e colaboradores (2019), observaram um aumento da atividade GST após 3 horas e diminuição após 7 dias de exposição de *Ruditapes philippinarum* em uma concentração de 15.000 ng.L<sup>-1</sup> de carbamazepine. Khoma e colaboradores (2022), realizaram um estudo para investigar os efeitos no mexilhão *Unio tumidus* expostos ao medicamento antipsicótico clorpromazina (Cpz), durante 14 dias, em uma concentração de aproximadamente 18.000 ng.L<sup>-1</sup>.

Rafiq e colaboradores (2023) detectaram um aumento na atividade GST nas glândulas digestivas em comparação ao controle, nas concentrações 5 ng.L<sup>-1</sup> de sertralina (concentração semelhante ao atual estudo com MDMA) e 10 ng.L<sup>-1</sup>. Neste estudo foi observado um aumento na atividade GST nas glândulas digestivas após o término dos experimentos.

A inibição da GPx observada na atual pesquisa pode ser prejudicial ao organismo, uma vez que a droga pode estar causando alguma alteração no sistema antioxidante. No entanto, De Felice *et al.* (2023) não identificaram efeitos na atividade de GPx em *D. magna* exposta por 21 dias a concentrações de 50 e 500 ng.L<sup>-1</sup> de MDMA. Em outros estudos, entretanto, resultados diferentes foram observados. Por exemplo, Parolini *et al.* (2015) expuseram *Dreissena polymorpha* a misturas contendo cocaína (50 ng.L<sup>-1</sup>), benzoylecgonina (300 ng.L<sup>-1</sup>), anfetamina (300 ng.L<sup>-1</sup>), morfina (100 ng.L<sup>-1</sup>) e 3,4-metilenodioximetanfetamina (50 ng.L<sup>-1</sup>) por 14 dias. Neste estudo, foi observada uma ativação significativa da atividade de GPx após 7 dias de exposição, considerando todas as concentrações previamente mencionadas, atingindo sua máxima expressão ao final do experimento, com valores 3 vezes maiores do que os valores basais. Em outro estudo, Parolini *et al.* (2018) observaram um aumento na atividade de GPx após 48 horas de exposição a 1000 ng.L<sup>-1</sup> de benzoylecgonina (BE) em *Daphnia magna*. Trombini e colaboradores (2019),

observaram uma diminuição da atividade GPx após 3 horas de exposição e um aumento na atividade GPx após 22 dias de exposição de *Ruditapes philippinarum* em uma concentração de 15000 ng.L<sup>-1</sup> de carbamazepine. Em relação à atividade GSH nas glândulas digestivas, Khoma e colaboradores (2022) observaram um aumento no nível, após expor o mexilhão *Unio tumidus* ao medicamento antipsicótico clorpromazina (Cpz) em uma concentração de aproximadamente 18.000 ng.L<sup>-1</sup> durante 14 dias. Resultado semelhante constatado neste estudo.

Ao observar a atividade de GPx na mesma concentração e tempo, pode-se notar a semelhança das respostas, indicando que a concentração de GSH pode ter sido necessária para um equilíbrio redox mais eficiente do organismo em resposta ao contaminante. Não foram encontrados na literatura efeitos relacionados ao GSH nas glândulas digestivas de organismos aquáticos expostos a substâncias psicoativas.

Em *C. gasar* exposta ao MDMA, o efeito de inibição de GST e GPx pode ter levado a um aumento nos danos oxidativos em concentrações mais altas. Parolini *et al.* (2015) também observaram um aumento significativo nos valores de LPO em *Dreissena polymorpha* após 11 dias de exposição a drogas: cocaína (50 ng.L<sup>-1</sup>), benzoilecgonina (300 ng.L<sup>-1</sup>), anfetamina (300 ng.L<sup>-1</sup>), morfina (100 ng.L<sup>-1</sup>) e 3,4-metilenodioximetanfetamina (50 ng.L<sup>-1</sup>). No entanto, esses resultados observados por Parolini *et al.* (2015) em LPO não têm uma correlação direta com os efeitos observados em GST e GPx do mesmo estudo. Todavia, ao contrário do presente estudo, danos nas fitas de DNA em glândulas digestivas expostas a drogas psicoativas foram detectados em outros estudos. Maranhão *et al.* (2017), ao expor *P. perna* a cocaína, detectaram que a genotoxicidade (quebras de fita de DNA) aumentou significativamente em mexilhões expostos a 500.000 ng.L<sup>-1</sup> após 48 horas de exposição. Cortez *et al.* (2019) também detectaram danos ao DNA na glândula digestiva de *Perna perna* após 48 horas de exposição a uma concentração de 30 ng.L<sup>-1</sup> de fluoxetina.

Os resultados do TRCVN demonstram uma diminuição na permeabilidade da membrana lisossomal dos hemócitos após 48 horas de exposição nas concentrações de 5, 50, 500 e 5000 ng/L<sup>-1</sup>. No entanto, após 96 horas de exposição, foi observada uma diminuição na permeabilidade nas concentrações de 50 e 500 ng/L<sup>-1</sup>. Esses achados corroboram outros estudos conduzidos com substâncias psicoativas. Ortega *et al.* (2019) encontraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no TRCVN de

mexilhões *Perna perna* expostos a crack após 96 e 168 horas nas concentrações de 500, 5000 e 50000 ng/L<sup>-1</sup> de crack, com alterações na estabilidade da membrana lisossomal. Cortez *et al.* (2019) observaram diferenças significativas na estabilidade da membrana lisossomal em mexilhões *P. perna* após 48 horas de exposição a fluoxetina na menor concentração estudada (3 ng/L<sup>-1</sup>). Maranhão *et al.* (2017) observaram uma diminuição na estabilidade da membrana lisossomal de *P. perna* a partir de 5000 ng/L<sup>-1</sup> após 48 horas de exposição à cocaína. Rafiq *et al.* (2023) detectaram a diminuição na estabilidade da membrana lisossomal de *M. Galloprovincialis*, nos seguintes contaminantes e concentrações: fluoxetina (5 ng.L<sup>-1</sup> e 10 ng.L<sup>-1</sup>); citalopram (5 ng.L<sup>-1</sup>); venlafaxina (10 ng.L<sup>-1</sup>) e sertralina (10 ng.L<sup>-1</sup>).

Portanto, com os resultados expostos, efeitos deletérios na estabilidade da membrana lisossomal do organismo são observados já no segundo dia de exposição, a partir da concentração ambientalmente relevante..

Sobre o músculo adutor, de forma semelhante ao resultado deste estudo, Parolini *et al.* (2018) observaram inibição significativa da atividade de AChE em *D. magna*, duas vezes maior do que o controle, após 48 horas de exposição a 500 ng.L<sup>-1</sup> e 1000 ng.L<sup>-1</sup> de benzoylecgonina (BE). Sendo assim, o MDMA apresenta potencial neurotóxico para *Crassostrea gasar*, mesmo em baixas concentrações e curtos períodos de exposição.

De acordo com os resultados apresentados no índice IBR, foram verificados que alguns biomarcadores do tratamento de controle obtiveram respostas mais evidentes, tais como GSH nas glândulas digestivas (7 dias), bem como, GST; GPX e GSH nas brânquias (4 dias), isso aconteceu pelo nível de estresse oxidativo geral dos animais devido às trocas de água realizadas durante os experimentos. Agora, referente aos tratamentos com concentrações de MDMA, foi constatado que na concentração de 5 ng.L<sup>-1</sup> os biomarcadores mais responsivos foram GST na glândula digestiva (2 dias) e GST nas brânquias (4 dias), demonstrando a tentativa de biotransformação do contaminante para a sua eliminação, causando também reações no sistema antioxidante em ambos os tecidos. Já, na concentração de 50 ng.L<sup>-1</sup> com 2 dias de exposição, foram constatadas maiores alterações na permeabilidade lisossomal de hemócitos do bivalve, evidenciado no gráfico pela maior resposta do ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro (TRCVN), na hemolinfa, demonstrando maiores possibilidades de danos celulares. A GST também foi

responsiva nas brânquias nesta concentração. Nas concentrações maiores foi verificado que na exposição a  $500 \text{ ng.L}^{-1}$  houveram uma expressividade na biotransformação de fase II, bem como, no sistema antioxidante nas brânquias, evidenciados pelos níveis de GST e GPX (4 dias), causando danos em DNA também nas brânquias (7 dias). Finalmente, na maior concentração de exposição,  $5000 \text{ ng.L}^{-1}$ , o biomarcador mais evidente foi o LPO na glândula digestiva (7 dias), demonstrando danos em peroxidação lipídica. Porém, outros biomarcadores foram expressivos resultados neste tratamento, como LPO na na glândula digestiva (4 dias); GST e GSH na glândula digestiva (4 dias); GST nas brânquias (4 dias) e alterações na permeabilidade lisossomal de hemócitos medido pelo teste de retenção do vermelho neutro, na hemolinfa (7 dias). Isso evidenciou uma ativação expressiva no sistema antioxidante, na tentativa de criar um balanço redox, causando assim danos em peroxidação lipídica em ambos os tecidos (glândula digestiva e brânquias).

Outros estudos corroboram com os resultados encontrados com o índice IBR, tais como o trabalho realizado por Magni e colaboradores (2017), os quais expuseram *Dreissena polymorpha* aos antidepressivos Fluoxetina (FLX) e Citalopram (CT) em uma concentração ambiental de  $500 \text{ ng.L}^{-1}$  durante 14 dias. Durante o experimento foi detectado dano oxidativo com peroxidação lipídica.

Em relação aos resultados dos testes histológicos, este é o primeiro estudo feito em bivalves expostos à drogas ilícitas psicoativas sintéticas e demonstrou efeitos significativos nas brânquias, onde há uma diminuição da distância interlamelar e da largura das lamelas conforme o aumento da concentração e tempo de exposição. Estas alterações estruturais nas brânquias podem causar danos irreversíveis ao organismo, como comprometimento nas trocas gasosas, filtração da água e alimento

O estresse oxidativo observado nas brânquias, após a verificação dos resultados bioquímicos apresentados pelos biomarcadores EROD, GST e GPx, pode ter levado aos danos histológicos observados nas brânquias de *C. gasar* após 7 dias de exposição ao MDMA, nas maiores concentrações  $500 \text{ ng.L}^{-1}$  e  $5000 \text{ ng.L}^{-1}$ . Porém, devido à lacuna na literatura atual, relativa à área de ecotoxicologia aquática e histopatologia em organismos marinhos, outros estudos necessitam ser realizados a fim de verificar os danos histopatológicos a estes animais expostos a drogas ilícitas.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, o MDMA causou toxicidade aguda com 60% das ostras após 48 horas de exposição, sendo 13% dos organismos mortos a exposições ambientais ( $5 \text{ ng.L}^{-1}$ ) e 63% dos organismos mortos expostos às exposições mais altas ( $500 \text{ ng.L}^{-1}$ ) e ( $5000 \text{ ng.L}^{-1}$ ).

Também foram observados efeitos subletais em *Crassostrea gasar* exposta à droga ilícita 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA). O tecido com a maior expressão de efeitos deletérios foi a glândula digestiva, devido à inibição do sistema de biotransformação de fase 2 (GST), bem como no sistema antioxidante (GPx), seguido por um aumento na peroxidação lipídica (LPO). A atividade da colinesterase (ChE) também foi inibida, indicando neurotoxicidade. Além disso, o biomarcador mais sensível aos efeitos deletérios foi a estabilidade da membrana lisossomal, com respostas observadas a partir de 48 horas de exposição em todas as concentrações testadas de MDMA.

Foi observado estresse oxidativo com posterior peroxidação lipídica e rompimento das membranas celulares. A droga ocasionou também disfunções neurológicas com a diminuição da colinesterase, prejudicando a movimentação de abertura e fechamento das valvas. Além disso, a exposição ao MDMA causou também alterações histológicas nas brânquias do bivalve, conforme aumento da dose e tempo de concentração. Estes efeitos danosos foram observados em concentrações ambientais.

Sendo assim, o MDMA pode ser considerado um contaminante com efeitos preocupantes para organismos filtradores marinhos, como os bivalves, indicando riscos ambientais devido ao seu crescente consumo em todo o mundo e à falta de estações de tratamento de efluentes eficazes na eliminação do composto.

## REFERÊNCIAS

Added, A., Khalloufi, N., Khazri, A., Harrath, A. H., Mansour, L., Nahdi, S., ... & Dellali, M. (2023). Effects of an endocrine disruptor triclosan on *Ruditapes decussatus*: multimarker and histological approaches. *Animals*, 13(3), 402.

Al-Hakeim, H. K., Altufaili, M. F., Alhaideri, A. F., Almulla, A. F., Moustafa, S. R., & Maes, M. (2023). Increased AGE–RAGE axis stress in methamphetamine abuse and methamphetamine-induced psychosis: Associations with oxidative stress and increased atherogenicity. *Addiction Biology*, 28(10), e13333.

Balloni, A., Tini, A., Prospero, E., Busardò, F. P., Huestis, M. A., & Lo Faro, A. F. (2024). Exposure to Synthetic Psychoactive Substances: A Potential Cause for Increased Human Hepatotoxicity Markers. *Clinical Chemistry*, 70(4), 597-628.

Beliaef B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21:1316–1322.

Bellot, M., Soria, F., López-Arnau, R., Gómez-Canela, C., & Barata, C. (2024). *Daphnia magna* an emerging environmental model of neuro and cardiotoxicity of illicit drugs. *Environmental Pollution*, 344, 123355.

Bijlsma, L., Serrano, R., Ferrer, C., Tormos, I., & Hernández, F. (2014). Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). *Science of the total environment*, 487, 703-709.

Bisagno, V., & Cadet, J. L. (2021). Methamphetamine and MDMA neurotoxicity: biochemical and molecular mechanisms. *Handbook of Neurotoxicity*, 1-24.

Bonsignore, A., Barranco, R., Morando, A., Fraternali Orcioni, G., & Ventura, F. (2019). MDMA induced cardio-toxicity and pathological myocardial effects: A systematic

review of experimental data and autopsy findings. *Cardiovascular toxicology*, 19, 493-499.

Bradford M.B. A Rapid And Sensitive Method For The Quantification Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. 1976.

Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D'Agostino, A., ... & Casini, S. (2021). Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111486.

Capela, J. P., & Carvalho, F. D. (2022). A review on the mitochondrial toxicity of "ecstasy"(3, 4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA). *Current Research in Toxicology*, 3, 100075.

Carmo, H., Brulport, M., Hermes, M., Oesch, F., Silva, R., Ferreira, L. M., ... & Hengstler, J. G. (2006). Influence of CYP2D6 polymorphism on 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16(11), 789-799.

Castilho-Westphal, G., Magnani, F., & Ostrensky, A. (2015). Gonad morphology and reproductive cycle of the mangrove oyster *Crassostrea gasar* (Lamarck, 1819) in the baía de Guaratuba, Paraná, Brazil. *Acta Zoologica*, 96, 99-107. <https://doi.org/10.1111/AZO.12055>.

Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B. S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., & Pandey, A. (2021). Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental Research*, 194, 110664.

Christophoridis, C., Veloutsou, S., Mitsika, E., Zacharis, C. K., Christia, C., Raikos, N., & Fytianos, K. (2021). Determination of illicit drugs and psychoactive pharmaceuticals

in wastewater from the area of Thessaloniki (Greece) using LC–MS/MS: estimation of drug consumption. *Environmental monitoring and assessment*, 193(5), 1-15.

Cortez, F. S., da Silva Souza, L., Guimarães, L. L., Pusceddu, F. H., Maranhão, L. A., Fontes, M. K., ... & Pereira, C. D. S. (2019). Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel *Perna perna*. *Marine pollution bulletin*, 141, 366-372.

Costa, G., & Gołembiowska, K. (2022). Neurotoxicidade do MDMA: Principais efeitos e mecanismos. *Experimental Neurology*, 347, 113894.

Costa, A. R., Gonçalves, V. M., Castro, B. B., Carrola, J. S., Langa, I., Pereira, A., ... & Ribeiro, C. (2023). Toxicity of the 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine and Its Enantiomers to *Daphnia magna* after Isolation by Semipreparative Chromatography. *Molecules*, 28(3), 1457.

Cunha, Ricardo Leal et al. An overview of New Psychoactive Substances (NPS) in northeast Brazil: NMR-based identification and analysis of ecstasy tablets by GC-MS. *Forensic Science International*, v. 344, p. 111597, 2023.

Da Cunha, Kelly Francisco et al. Prevalence of new psychoactive substances (NPS) in Brazil based on oral fluid analysis of samples collected at electronic music festivals and parties. *Drug and alcohol dependence*, v. 227, p. 108962, 2021.

Da Silveira Guerreiro, A., Monteiro, J. S., Medeiros, I. D., & Sandrini, J. Z. (2020). First evidence of transcriptional modulation by chlorothalonil in mussels *Perna perna*. *Chemosphere*, 255, 126947.

De Almeida, E. A., Bairy, A. C. D., de Melo Loureiro, A. P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Onuki, J., ... & Di Mascio, P. (2007). Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment:

antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 588-600.

De La Torre, R., Yubero-Lahoz, S., Pardo-Lozano, R., & Farré, M. (2012). MDMA, methamphetamine, and CYP2D6 pharmacogenetics: what is clinically relevant?. *Frontiers in genetics*, 3, 235.

De Felice, Salgueiro-González N, Castiglioni S, Saino N, Parolini M(2019) Biochemical and behavioral effects induced by cocaine exposure to *Daphnia magna*. *Sci Total Environ* 689:141–148.

De Felice, B., & Parolini, M. (2020). Effects of single and combined exposure to cocaine and benzoylecgonine on the oxidative status of *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 80, 103475.

De Felice, Beatrice; PAROLINI, Marco. Exposure to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced biochemical but not behavioral effects in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, p. 104163, 2023.

Depledge, M.H. (1994). The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological Tools. In Fossi, M.C. and Leonzio, C., Eds., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publisher, Boca Raton, 271-295

De Mattos Amaral, É. B., & dos Santos, C. V. (2022). Poluição e invasão de mangues em zonas litorâneas. *Unisantia BioScience*, 11(2), 117-123.

Devin S, Burgeot T, Giambérini L et al (2014) The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res* 21:2448–2454. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>.

Dos Santos, F. S., Neves, R. A. F., de Carvalho, W. F., Krepsky, N., & Crapez, M. A. C. (2018). Evaluation of the immune responses of the brown mussel *Perna perna* as indicators of fecal pollution. *Fish & shellfish immunology*, 80, 115-123.

Dos Santos, F. S., Neves, R. A., Crapez, M. A. C., Teixeira, V. L., & Krepsky, N. (2022). How does the brown mussel *Perna perna* respond to environmental pollution? A review on pollution biomarkers. *Journal of Environmental Sciences*, 111, 412-428.

Dragomir, L., Marina, V., Anghel, M., Anghel, A. D., & Moscu, C. A. (2023). Incidence of intoxications in the emergency department of Galati Hospital with examples of cardiovascular effects of MDMA intoxication. *Diagnostics*, 13(5), 940.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr, Featherstone, R.M. A New And Rapid Colorimetric Determination Of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88–95. 1961.

Faro, A. F. L., Sprega, G., Beradinelli, D., Tini, A., Poyatos, L., Papaseit, E., ... & Chankvetadze, B. (2024). Development of enantioselective high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 3, 4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) and its phase-1 metabolites in human biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238, 115768.

Figurasin R, Maguire NJ. 3,4-Metilenodioximetanfetamina. 2020 24 de maio. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30860717.

Fontes, Mayana Karoline; Maranhão, Luciane Alves; Pereira, Camilo Dias Seabra. Review On The Occurrence And Biological Effects Of Illicit Drugs In Aquatic Ecosystems. *Environmental Science And Pollution Research International*, 2020.

Gagné, F., Blaise, C. Hepatic Metallothionein Level And Mixed Function Oxidase Activity In Fingerling Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) After Acute Exposure To Pulp And Paper Mill Effluents. *Water Res* 27:1669–1682. 1993.

Georgiou-Siafis, S. K., & Tsiftoglou, A. S. (2023). The key role of GSH in keeping the redox balance in mammalian cells: mechanisms and significance of GSH in detoxification via formation of conjugates. *Antioxidants*, 12(11), 1953.

Gosling, Elizabeth. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley & Sons, 2008.

Henríquez-Hernández LA, Rojas-Hernández J, Quintana-Hernández DJ, Borkel LF. Hofmann vs. Paracelsus: Do Psychedelics Defy the Basics of Toxicology?—A Systematic Review of the Main Ergolamines, Simple Tryptamines, and Phenylethylamines. *Toxics*. 2023; 11(2):148. <https://doi.org/10.3390/toxics11020148>

Hickman, C. P., Roberts, L. S., & Keen, S. L. (2016). *Principios integrados de zoología Grupo Gen-Guanabara* Koogan.

Jayanthi, S., Daiwile, A. P., & Cadet, J. L. (2021). Neurotoxicity of methamphetamine: Main effects and mechanisms. *Experimental neurology*, 344, 113795.

Jîtcă, G., Ősz, B. E., Tero-Vescan, A., & Vari, C. E. (2021). Psychoactive drugs—from chemical structure to oxidative stress related to dopaminergic neurotransmission. A review. *Antioxidants*, 10(3), 381.

Keerthanan, S., Jayasinghe, C., Biswas, J. K., & Vithanage, M. (2021). Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) in the environment: Plant uptake, translocation, bioaccumulation, and human health risks. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(12), 1221-1258.

Khan, S., Naushad, M., Govarthan, M., Iqbal, J., & Alfadul, S. M. (2022). Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. *Environmental Research*, 207, 112609.

Khoma, Vira et al. Environmental concentrations of Roundup in combination with chlorpromazine or heating causes biochemical disturbances in the bivalve mollusc *Unio tumidus*. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-12, 2022.

Lazoski, C., Gusmão, J., Boudry, P., & Solé-Cava, A. M. (2011). Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Marine Ecology Progress Series*, 426, 197-212.

Leis, M., Abad, T. N., Martinez, M. F., Calcagno, J. A., Sabatini, S. E., & Genovese, G. (2024). Histological alterations as a recommended biomarker in the mussel *Mytilus platensis* (Bivalvia, Mytilidae) to study anthropic impact on seaports. *Regional Studies in Marine Science*, 70, 103373.

Lewis, B. R., & Byrne, K. (2023). A Review of MDMA-Assisted Therapy for Posttraumatic Stress Disorder. *Focus*, 21(3), 247-256.

Lima, Daniel Cassiano. *Zoologia de invertebrados / Daniel Cassiano Lima*. 1. ed. Reimpressão . – Fortaleza : EdUECE , 2015. 169 p. ; il. ; 20,0cm x 25,5cm. (Ciências Biológicas).

Liu, C., Chang, V. W., & Gin, K. Y. (2013). Environmental toxicity of PFCs: An enhanced integrated biomarker assessment and structure–activity analysis. *Environment. Toxicol. Chem.* 32(10), 2226-2233.

Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H. Contaminant-Induced Lysosomal Membrane Damage In Blood Cells Of Mussels *Mytilus Galloprovincialis* From The Venice Lagoon: An In Vitro Study. *Mar Ecol Prog Series* 129: 189-196. 1995.

Lugo Vargas, A. F., Quevedo Buitrago, W. G., Chaves Silva, D. C., & Martínez Suárez, J. F. (2022). Voltammetric Responses of a CYP2D6-Based Biosensor to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and the Synthetic Cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinopentiophenone ( $\alpha$ -PVP). *ChemistrySelect*, 7(42), e202202748.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.

Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI journal*, 17, 1101.

Machado, I. C. et al. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu e Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cananéia SP, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 61, n. 1, p. 13–8, 28 jun. 2002.

Maasz, G., Molnar, E., Mayer, M., Kuzma, M., Takács, P., Zrinyi, Z., ... & Kiss, T. (2021). Illicit drugs as a potential risk to the aquatic environment of a large freshwater lake after a major music festival. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(5), 1491-1498.

Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L. F., Catani, M., Guzzinati, R., ... & Binelli, A. (2017). Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Science of the Total Environment*, 578, 452-459.

Maranho, L. A., Fontes, M. K., Kamimura, A. S. S., Nobre, C. R., Moreno, B. B., Pusceddu, F. H., ... & Pereira, C. D. S. (2017). Exposure to crack cocaine causes adverse effects on marine mussels *Perna perna*. *Marine pollution bulletin*, 123(1-2), 410-414.

Maranho L, Fontes Mk, Kamimura Ass, Nobre Cr, Moreno Bb, Pusceddu Fh, Cortez Fs, Lebre Dt, Marques Jr, Abessa Dms, Ribeiro Da, Pereira Cds (2017) Exposure To Crack Cocaine Causes Adverse Effects On Marine Mussels *Perna perna*. *Mar Pollut Bull* 123(1–2):410–414.

Marinsek, G. P., Ribeiro, C. C., Gusso-Choueri, P. K., Choueri, R. B., de Souza Abessa, D. M., & de Britto Mari, R. (2024). Multiple biomarkers in pufferfish as a proxy

of environmental health in Brazilian marine protected areas. *Science of The Total Environment*, 914, 169742.

Mattos, J. J., Siebert, M. N., & Bainy, A. C. D. (2024). Integrated biomarker responses: a further improvement of IBR and IBRv2 indexes to preserve data variability in statistical analyses. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(1), 871-881.

Mastroianni N, Bleda Mj, López De Alda M, Barceló D (2016) Occurrence Of Drugs Of Abuse In Surface Water From Four Spanish River Basins: Spatial And Temporal Variations And Environmental Risk Assessment. *J Hazard Mater* 316:134–142.

Maynou, F., Costa, S., Freitas, R., & Solé, M. (2021). Effects of triclosan exposure on the energy budget of *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* under climate change scenarios. *Science of The Total Environment*, 777, 146068.

Menzel, W. (1991). *Estuarine and marine bivalve mollusk culture*. CRC Press.

Mezzelani, Marica *et al.* Exposure to environmental pharmaceuticals affects the macromolecular composition of mussels digestive glands. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 9369, 2024.

Miino, M. C., Macsek, T., Halešová, T., Chorazy, T., & Hlavínek, P. (2023). Pharmaceutical and narcotics monitoring in Brno wastewater system and estimation of seasonal effect on the abuse of illicit drugs by a wastewater-based epidemiology approach. *Science of The Total Environment*, 164386.

Mitchell, J. M., Bogenschutz, M., Lilienstein, A., Harrison, C., Kleiman, S., Parker-Guilbert, K., ... & Doblin, R. (2023). MDMA-assisted therapy for severe PTSD: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Focus*, 21(3), 315-328.

Mohan, H., Rajput, S. S., Jadhav, E. B., Sankhla, M. S., Sonone, S. S., Jadhav, S., & Kumar, R. (2021). Ecotoxicity, Occurrence, and Removal of Pharmaceuticals and Illicit

Drugs from Aquatic Systems. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11, 12530-12546.

Nero, V., Farwell, A., Lister, A., Van der Kraak, G., Lee, L.E., Van Meer, T., MacKinnon, M.D., Dixon, D.G., 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 365-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.014>.

Nilchi, S., Neyshaburinezhad, N., Rouini, M., Lavasani, H., Foroumadi, A., & Ardakani, Y. H. (2022). Study the effect of 3, 4-Methylenedioxy methamphetamine on cytochrome P450 2E1 activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58.

Oeri, HE (2020). Além do ecstasy: Entactogens alternativos para 3,4-metilenodioximetanfetamina com aplicações potenciais em psicoterapia. *Journal of Psychopharmacology*, 0269881120920420.

Olive, P. L. Dna Precipitation Assay: A Rapid And Simple Method For Detecting Dna Damage In Mammalian Cells. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 11(4), 487-495. 1988.

Oluwole, A. O., Omotola, E. O., & Olatunji, O. S. (2020). Pharmaceuticals and personal care products in water and wastewater: A review of treatment processes and use of photocatalyst immobilized on functionalized carbon in AOP degradation. *BMC chemistry*, 14(1), 1-29.

Ortega, A. D. S. B., Maranhão, L. A., Nobre, C. R., Moreno, B. B., Guimarães, R. S., Lebre, D. T., ... & Pereira, C. D. S. (2019). Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel *Perna perna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(27), 27569-27578.

Otegui, M. B. P., Fiori, S. M., Menechella, A. G., Dos Santos, E. P., & Gimenez, J. (2024). Histological characterization and morphological alterations in gill and digestive gland in non-native bivalve from the Province of Buenos Aires: spatial and seasonal evaluation. *Zoologischer Anzeiger*, 312, 11-19.

Parolini M, Magni S, Castiglioni S, Zuccato E, Binelli A (2015) Realistic Mixture Of Illicit Drugs Impaired The Oxidative Status Of The Zebra Mussel (*Dreissena Polymorpha*). *Chemosphere* 128:96–102.

Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., & Binelli, A. (2016). Genotoxic effects induced by the exposure to an environmental mixture of illicit drugs to the zebra mussel. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 26-30.

Parolini, M., De Felice, B., Ferrario, C., Salgueiro-González, N., Castiglioni, S., Finizio, A., & Tremolada, P. (2018). Benzoylcegonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. *Environmental pollution*, 232, 236-244.

Qian, L., Ruan, Y., Gong, X., Yu, Z., Lin, S., Li, X., ... & Liu, Y. (2024). The neuroprotective effect of LCZ696 on methamphetamine-induced cognitive impairment in mice. *Neuroscience letters*, 823, 137630.

Rafiq, Ayesha et al. Antidepressants and their metabolites primarily affect lysosomal functions in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, v. 903, p. 166078, 2023.

Rafiq, A., Capolupo, M., Addesse, G., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2023). Antidepressants and their metabolites primarily affect lysosomal functions in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Science of the Total Environment*, 903, 166078.

Rathi, BS, Kumar, PS e Show, PL (2021). A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. *Journal of hazardous materials*, 409, 124413.

Rein, B., Raymond, K., Boustani, C., Tuy, S., Zhang, J., St. Laurent, R., ... & Malenka, R. C. (2024). MDMA enhances empathy-like behaviors in mice via 5-HT release in the nucleus accumbens. *Science Advances*, 10(17), eadl6554.

Reyes, N. J. D. G., Geronimo, F. K. F., Yano, K. A. V., Guerra, H. B., & Kim, L. H. (2021). Pharmaceutical and Personal Care Products in Different Matrices: Occurrence, Pathways, and Treatment Processes. *Water* 2021, 13, 1159.

Rizzi, C., Seveso, D., Galli, P., & Villa, S. (2020). First record of emerging contaminants in sponges of an inhabited island in the Maldives. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111273.

Roveri, V., Guimarães, L. L., Toma, W., & Correia, A. T. (2021). Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and cocaine around the coastal submarine sewage outfall in Guarujá, São Paulo State, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 11384-11400.

Sedlak, J. e Lindsay, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, v.25, p.192-205, 1968.

Senta I, Krizman I, Ahel M, Terzic S (2015) Multiresidual Analysis Of Emerging Amphetamine-Like Psychoactive Substances In Wastewater And River Water. *J Chromatogr A* 1425:204–212.

Shenai-Tirodkar, P. S., Gauns, M. U., Mujawar, M. W. A., & Ansari, Z. A. (2017). Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 87-94.

Siebert, M. N., Mattos, J. J., Toledo-Silva, G., Razzera, G., & Bairy, A. C. D. (2017a). Candidate cytochrome P450 genes for ethoxyresorufin O-deethylase activity in oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 189, 142-149.

Sies H, Koch OR, Martino E, Boveris A (1979) Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett* 103(2):287–290.

Sims, D. B. *et al.* Occurrence, source, and ecological risk of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water in Las Vegas, USA. *International Journal of Environmental Science and Technology*, p. 1-16, 2024.

Sims, D. B. *et al.* Occurrence, source, and ecological risk of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water in Las Vegas, USA. *International Journal of Environmental Science and Technology*, p. 1-16, 2024.

Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1-2), 21-26.

Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1501-1514.

Trombini, Chiara; HAMPEL, Miriam; BLASCO, Julián. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology*, v. 208, p. 146-156, 2019.

UNODC (United Nations Office On Drugs And Crime). World Drug Report. (2019). Booklet4:Stimulants.Viena,At:UnitedNations.88P.[https://Wdr.Unodc.Org/Wdr2019/Pr elaunch/Wdr19\\_Booklet\\_4\\_Stimulants.Pdf](https://Wdr.Unodc.Org/Wdr2019/Pr elaunch/Wdr19_Booklet_4_Stimulants.Pdf).

Acessado em 13/07/2020.

UNODC (United Nations Office On Drugs And Crime). World Drug Report. (2020). Booklet 2: Drug use and health consequences. Viena, At: United Nations. 52 P.[https://wdr.unodc.org/wdr2020/field/WDR20\\_Booklet\\_2.pdf](https://wdr.unodc.org/wdr2020/field/WDR20_Booklet_2.pdf)

Acessado em 21/06/2021.

UNODC, World Drug Report 2023 (United Nations publication, 2023). World Drug Report 2023 (unodc.org)

Acessado em 04/03/2024.

Verovšek, T., Šuštarčič, A., Laimou-Geraniou, M., Krizman-Matasic, I., Prosen, H., Eleršek, T., ... & Heath, E. (2023). Removal of residues of psychoactive substances during wastewater treatment, their occurrence in receiving river waters and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 866, 161257.

Vizeli, P., Schmid, Y., Prestin, K., Zu Schwabedissen, H. E. M., & Liechti, M. E. (2017). Pharmacogenetics of ecstasy: CYP1A2, CYP2C19, and CYP2B6 polymorphisms moderate pharmacokinetics of MDMA in healthy subjects. *European Neuropsychopharmacology*, 27(3), 232-238.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vandebussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (5), 1797–1808.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullock B. (eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp. 127-150

Youssef, F. F. (2024). Psychoactive drugs. *Pharmacognosy*, 397-407.

Zhao, J., Lu, J., Zhao, H., Yan, Y., & Dong, H. (2023). In five wastewater treatment plants in Xinjiang, China: Removal processes for illicit drugs, their occurrence in receiving river waters, and ecological risk assessment. *Chemosphere*, 139668.