



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Gabriel de Farias Araujo

**Monitoramento e avaliação ecotoxicológica de níveis ambientais de cocaína
e benzoilecgonina em águas fluviais no Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2023

Gabriel de Farias Araujo

**Monitoramento e avaliação ecotoxicológica de níveis ambientais de cocaína
e benzoilecgonina em águas fluviais no Rio de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia.

Coorientador: Prof. Dr. Enrico M. Saggiaro.

Rio de Janeiro

2023

Título do trabalho em inglês: Monitoring and ecotoxicological assessment of environmental levels of cocaine and benzoilecgonine in river waters in Rio de Janeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - Código de Financiamento 001.

A663m

Araujo, Gabriel de Farias.

Monitoramento e avaliação ecotoxicológica de níveis ambientais de cocaína e benzoilecgonina em águas fluviais no Rio de Janeiro / Gabriel de Farias Araujo. -- 2023.
220 f. : il.color, mapas.

Orientador: Fábio Veríssimo Correia.

Coorientador: Enrico Mendes Saggioro.

Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.

Bibliografia: f. 128-144.

1. Estresse Oxidativo. 2. Detecção do Abuso de Substâncias. 3. Drogas Ilícitas. 4. Contaminantes Emergentes. 5. Ecotoxicologia Aquática. I. Título.

CDD 362.29

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348 Biblioteca de Saúde Pública

Gabriel de Farias Araujo

**Monitoramento e avaliação ecotoxicológica de níveis ambientais de cocaína
e benzoilecgonina em águas fluviais no Rio de Janeiro**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Toxicologia Ambiental

Aprovada em: 31 de maio de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Márcia Marques Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Universidade de Brasília

Prof.^a Dra. Renata Jurema Medeiros
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggiaro (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela misericórdia, graça, força e presença, além da muita paciência comigo.

À minha família, Renata, Deise, Vladimir (em memória), Leonardo, Benedicto e Daniel, sem esquecer de Ana Lúcia, Matheus, Ilma e Renato, por todo apoio, carinho e essencial suporte com amor ininterrupto.

A meus colegas de laboratório e amigos de sala de aula, obrigado por toda ajuda, pela amizade e suporte!

Ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do IOC/FIOCRUZ, ao Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem da UFRJ, ao Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e Efluentes da UERJ, ao Laboratório de Fisiologia e Biotério Zebrafish do INCQS/FIOCRUZ e ao Departamento de Saúde e Saneamento Ambiental da FIOCRUZ, pelo apoio a este projeto, parceria estabelecida e novas amizades adquiridas.

Aos professores Henrique Pereira, Márcia Marques, Renata Medeiros e Rachel Hauser Davis, por terem acreditado neste projeto, apoiando com a estrutura de seus laboratórios e direcionamentos imprescindíveis.

Aos meus professores orientadores, Dr. Enrico Saggioro e Dr. Fábio Veríssimo, pela dedicação e apoio, principalmente considerando a pandemia de COVID-19 (em vigor durante todo o projeto) e o recente incêndio do prédio onde estava sediado nosso laboratório LAPSA/FIOCRUZ. Obrigado.

Aos amigos e colegas que participaram diretamente na execução deste projeto, Vanessa Santos, Isabelle Nunes, Deivisson Cunha, Rodrigo Coutinho, Magno Magalhães, Renata Medeiros, Lais Costa, Sidney Fernandes Sales Júnior e Lorena Soares.

À minha amiga Selma, por todo incentivo, apoio e amizade.

À ENSP-FIOCRUZ, CAPES e FAPERJ, pelo suporte e apoio financeiro a este projeto, inclusive sob a forma de bolsa de estudos.

“Não sejas sábio a teus próprios olhos; teme ao Senhor e aparta-te do mal.”

(Bíblia [...], Provérbios 3-7)

RESUMO

Cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE), seu principal metabólito, vêm sendo detectadas em corpos hídricos. A literatura relacionada a efeitos de concentrações ambientais de COC e BE (μg e ng L^{-1}) sobre organismos aquáticos não-alvo é escassa, sobretudo no modelo *Danio rerio* (*zebrafish*). Neste estudo, concentrações de COC e BE foram investigadas em cinco rios urbanos na cidade do Rio de Janeiro em campanhas de monitoramento nas estações seca e chuvosa. O espectrômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo Scientific) com ionização electrospray (ESI) foi utilizado na detecção de COC e BE nas amostras de água a partir de extração em fase sólida e análise em sistema Dionex 3000 UHPLC (Thermo Scientific). Embriões de *zebrafish* foram expostos à COC e BE por 96 h ($50\text{-}5000 \text{ ng L}^{-1}$), utilizando o OECD Fish Embryo Toxicity Test adaptado em placas de 24 poços, verificando-se efeitos morfológicos e teratogênicos. *Zebrafish* adultos foram expostos por 21 dias à COC ($10\text{-}1000 \text{ ng L}^{-1}$), BE ($10\text{-}1000 \text{ ng L}^{-1}$) e sua combinação (COC+BE $10\text{+}1000 \text{ ng L}^{-1}$ e COC+BE $1000\text{+}10 \text{ ng L}^{-1}$), analisando-se biomarcadores antioxidantes e oxidativos. Cocaína e BE foram quantificadas ($> \text{LQ}$) com 100 % de frequência em todas as campanhas e pontos de coleta, indicando a contaminação potencial desses ambientes e sugerindo a exposição ininterrupta de organismos não-alvo. Maiores níveis médios de COC ($383,68 \pm 269,57 \text{ ng L}^{-1}$) e BE ($1022,16 \pm 535,04 \text{ ng L}^{-1}$) foram observados na estação chuvosa comparados à estação seca (COC $192,27 \pm 127,23 \text{ ng L}^{-1}$; BE $504,30 \pm 382,28 \text{ ng L}^{-1}$), contrastando com os maiores resultados de N-NH_3 e DQO observados nesta estação (estação seca), sugerindo a influência do comportamento de consumo de COC associado à primavera/verão (estação chuvosa). Alterações morfológicas e teratogênicas foram observadas nos embriões expostos, com efeitos acima do observado no controle já a partir da menor concentração de BE (50 ng L^{-1}) testada, a qual correspondeu à menos de 10 % da concentração média de BE monitorada. Modulações de biomarcadores de estresse oxidativo (principalmente no cérebro) foram observadas nos peixes adultos expostos, bem como estresse oxidativo associado à peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas. Os resultados alertam para a presença de COC e BE em rios do Rio de Janeiro em níveis capazes de causar efeitos deletérios em organismo não-alvo, deflagrando um alarmante problema de saúde pública e meio ambiente.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; ecotoxicologia aquática; estresse oxidativo; drogas de abuso.

ABSTRACT

Cocaine (COC) and benzoylecgonine (BE) (main metabolite) have been detected in water sources. The literature on the effects of COC and BE environmental concentrations (μg and ng L^{-1}) in non-target aquatic organisms is scarce, especially in the *Danio rerio* model (*zebrafish*). In this study, COC and BE concentrations were investigated in five urban rivers in Rio de Janeiro City, in monitoring campaigns in the dry and rainy seasons. The Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific) with electrospray ionization (ESI) was used to detect COC and BE in water samples after solid phase extraction and analysis in a Dionex 3000 UHPLC system (Thermo Scientific). *Zebrafish* embryos were exposed to COC and BE for 96 h ($50\text{-}5000 \text{ ng L}^{-1}$), using the OECD Fish Embryo Toxicity Test adapted in 24-well plates, verifying morphological and teratogenic effects. Adult *zebrafish* were exposed for 21 days to COC ($10\text{-}1000 \text{ ng L}^{-1}$), BE ($10\text{-}1000 \text{ ng L}^{-1}$) and their combination (COC+BE $10\text{+}1000 \text{ ng L}^{-1}$ and COC+BE $1000\text{+}10 \text{ ng L}^{-1}$), analyzing antioxidant and oxidative biomarkers. Cocaine and BE were quantified ($> \text{LQ}$) with 100% frequency in all campaigns and sampled rivers, indicating the potential contamination of these environments and suggesting the uninterrupted exposure of non-target organisms. Higher average levels of COC ($383.68 \pm 269.57 \text{ ng L}^{-1}$) and BE ($1022.16 \pm 535.04 \text{ ng L}^{-1}$) were observed in the rainy season compared to the dry season (COC $192.27 \pm 127, 23 \text{ ng L}^{-1}$; BE $504.30 \pm 382.28 \text{ ng L}^{-1}$), contrasting with the higher N-NH₃ and COD results observed in this season (dry season), suggesting the influence of COC consumption behavior associated with spring/summer (rainy season). Morphological and teratogenic alterations were observed in the exposed embryos, with effects above those observed in the control already from the lowest BE tested concentration (50 ng L^{-1}), which corresponded to less than 10% of the average concentration of monitored BE. Modulations of oxidative stress biomarkers (mainly in the brain) were observed in exposed adult fish, as well as oxidative stress associated with lipid peroxidation and protein carbonylation. The results alert to the COC and BE presence in Rio de Janeiro rivers at levels capable of causing deleterious effects in non-target organisms, triggering an alarming public health and environmental problem.

Keywords: emerging contaminants; aquatic ecotoxicology; oxidative stress; drugs of abuse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma dos processos de transformação de cocaína.....	18
Figura 2	Mapa dos principais fluxos globais de COC.....	21
Figura 3	Regiões hidrográficas do estado do Rio de Janeiro.....	30
Figura 4	Mapa do MRJ dividido as RHs II-Guandu e V-Baía de Guanabara....	30
Figura 5	Áreas urbanizadas e não urbanizadas no Mapa do MRJ.....	31
Figura 6	Macrorregiões de Drenagem no Mapa do MRJ.....	32
Figura 7	Macrorregiões de Drenagem no Mapa do MRJ.....	34
Figura 8	Monitoramento do Índice de Qualidade de Água no MRJ.....	36
Figura 9	Dados de distribuição de estudos no globo.....	45
Figura 10	Relação dos estudos indexados investigados.....	47
Figura 11	Mapa dos pontos de coleta em águas fluviais.....	73
Figura 12	Cromatogramas representativos das análises de COC e BE.....	88
Figura 13	Parâmetros de performance do método.....	89
Figura 14	Concentrações COC e BE monitoradas.....	99
Figura 15	Efeitos observados nos embriões expostos.....	106
Figura 16	Atividade de SOD em cérebro e fígado de peixes expostos.....	110
Figura 17	Atividade de CAT em fígado de peixes expostos.....	112
Figura 18	Atividade de GST no cérebro e fígado dos peixes expostos.....	114
Figura 19	Níveis de TOT em cérebro e fígado de peixes expostos.....	115
Figura 20	Níveis de MDA em cérebro e fígado dos peixes expostos.....	117
Figura 21	Carbonilação de proteínas no cérebro e fígado dos peixes expostos...	120
Figura 22	Análise de componentes principais.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características químicas de COC e BE.....	23
Quadro 2	Alguns estudos de detecção de COC e BE ao redor do mundo.....	24
Quadro 3	Alguns estudos de detecção de COC e BE no Brasil.....	25
Quadro 4	Domicílios particulares permanentes por existência de banheiros e sanitários.....	29
Quadro 5	Abordagem droga de abuso - Substância testada, concentração / tempo de exposição empregados, organismo modelo, testes realizados e efeitos observados em estudos de COC e/ou BE sobre zebrafish.....	40
Quadro 6	Abordagem contaminante ambiental - Substância testada, concentração / tempo de exposição empregados, organismo modelo, testes realizados e efeitos observados em estudos de COC e/ou BE sobre zebrafish.....	44
Quadro 7	Planejamento das exposições dos embriões de zebrafish COC e BE.....	79
Quadro 8	Sistema de scores de efeitos aplicáveis aos embriões expostos.....	80
Quadro 9	Planejamento das exposições dos peixes zebrafish adultos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados pluviométricos e resultados físico-químicos, conforme valores máximo, médio e mínimo de cada ponto de coleta durante estações seca e chuvosa.....	92
Tabela 2	Concentrações gerais de COC e BE em valores máximo, médio e mínimo durante estações seca e chuvosa.....	96
Tabela 3	Scores observados nas exposições à COC e BE.....	104
Tabela 4	Frequência (%) dos efeitos observados nos embriões expostos à COC e BE.....	105
Tabela 5	Casos de morte observados nas exposições à COC e BE.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
DTNB	Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzóico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GPX	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-transferase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial de Hidrogênio
SOD	Superóxido Dismutase
UV-VIS	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	COCAÍNA E A SAÚDE PÚBLICA	16
3.2	COCAÍNA E O MEIO AMBIENTE	22
3.3	PROSPECÇÕES FINAIS DO REFERENCIAL TEÓRICO.....	67
4	METODOLOGIA	69
4.1	REAGENTES E PROCEDIMENTOS LABORATORIAS.....	69
4.2	PRIMEIRA ETAPA: MONITORAMENTO AMBIENTAL DE COC E BE.....	71
4.3	SEGUNDA ETAPA: ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM <i>ZEBRAFISH</i>	78
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	87
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1	MONITORAMENTO DE ÁGUAS FLUVIAIS	88
5.2	ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH</i>	103
5.3	ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>ZEBRAFISH</i> ADULTOS.....	109
6	CONCLUSÃO	126
	REFERÊNCIAS	128
	ANEXO I – LICENÇA CEUA FIOCRUZ	145
	ANEXO II – DADOS PLUVIOMÉTRICOS E FÍSICO-QUÍMICOS	146
	ANEXO III – RESULTADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE COC E BE	150
	ANEXO IV – RESULTADOS DO FET TEST	153
	ANEXO V – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	161
	ANEXO VI – CROMATOGRAMAS	163

1. INTRODUÇÃO

Os índices de consumo de cocaína (COC) ao redor do mundo vêm alarmando instituições e sociedade civil. Segundo o *World Drug Report*, o consumo de COC em 2020 alcançou a marca de 21 milhões de usuários (UNODC, 2022a). Já o Brasil, apresentaria cerca de 1,5 milhões de usuários, sendo indicado como o principal mercado da América do Sul (UNODC, 2021a). O Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas (OBID), publicou um levantamento em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, indicando que cerca de 2,9 % dos entrevistados já fizeram uso de COC ao menos uma vez (OBID, 2009). O Levantamento Nacional de Álcool e Drogas publicou que em 2012 cerca de 316 mil adolescentes e 5 milhões de adultos já haviam experimentado cocaína no Brasil (LENAD, 2012).

O consumo de COC leva o usuário à uma estado de euforia, podendo acarretar taquicardia, aumento da pressão arterial, ansiedade, inquietação e problemas do sono (AGHAZADEH TABRIZI, 2017; NIDA, 2016). Seu uso contínuo (exposição repetida) pode afetar a sensibilidade do indivíduo à COC, podendo resultar na necessidade de doses cada vez maiores para obtenção do mesmo estado de prazer e alívio da abstinência (NIDA, 2016). Outros agravos possíveis são insuficiência renal, convulsões e deficiência cognitiva, além do aumento do risco de um episódio fatal subsequente à experiências de overdose não fatais (UNODC, 2018b).

Uma vez no organismo, a COC é metabolizada principalmente no fígado, resultando em metabólitos como a benzilecgonina (BE) (35-54 %) e o éster metílico de ecgonina (EME) (32-49 %), seguindo-se sua excreção principalmente pela urina (FONTES *et al.*, 2019; GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015; MOOLCHAN *et al.*, 2000; PAROLINI *et al.*, 2017). Dessa forma, tanto COC, quanto seus metabólitos ativos, têm aportado em corpos hídricos via esgotos domésticos, seja a partir de esgotos clandestinos ou de estações de tratamento de esgoto (ETEs) (FONTES *et al.*, 2019). Segundo Sposito *et al.* (2018), isso se dá devido à baixa eficiência das estações de tratamento na remoção desses contaminantes. No caso de rios sem ETEs ao longo de seu curso, o principal aporte de COC e BE estaria associado à esgotos clandestinos.

Com isso, COC e seu metabólito (BE) vêm sendo detectados nos ambientes aquáticos ao redor do mundo, podendo ser citadas investigações em esgotos (3,7-1200 ng L⁻¹ de COC e 29-2700 ng L⁻¹ de BE) nos EUA, Canadá, Espanha, Polônia e Polônia (BIJLSMA *et al.*, 2014; DAGLIOGLU; GUZEL; KILERCIOGLU, 2019; METCALFE *et al.*, 2010; SULEJ-SUCHOMSKA *et al.*, 2020; WATANABE *et al.*, 2020), em águas superficiais (0,3-134 ng L⁻¹ de COC e 1,2-520 ng L⁻¹ de BE) nos EUA, Bélgica e Hungria (KONDOR *et al.*, 2020; VAN

NUIJS et al., 2009a; WATANABE et al., 2020), além da detecção em águas de abastecimento na Suécia (0,2 ng L⁻¹ de BE) (KARKI et al., 2020). No território nacional, COC e BE vêm sendo detectadas nas concentrações de ng L⁻¹ e µg L⁻¹, podendo ser mencionados estudos em água do mar (203,6-400 ng L⁻¹ de COC e 38,6 ng L⁻¹ de BE) (FONTES et al., 2019; PEREIRA et al., 2016), águas superficiais (62-2650 ng L⁻¹ de COC e 139-1019 ng L⁻¹ de BE) (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017; SHIHOMATSU et al., 2017) e em esgoto (1080-1983 ng L⁻¹ de COC e ng L⁻¹ de BE) (DA SILVA et al., 2018; SILVA, 2012; SODRÉ et al., 2018). Apesar desses dados, até a presente data não há estudos de detecção de COC e seus subprodutos no estado do Rio de Janeiro.

Uma vez conhecida a relação entre COC, BE e esgotos domésticos, cabe ressaltar que estas substâncias são apenas parcialmente removidas em ETEs (MALDANER *et al.*, 2012; MONTAGNER; JARDIM, 2011). Desde 2010, o grupo *Sewage analysis CORE group — Europe (SCORE)* vem ganhando proeminência na padronização do monitoramento enquanto exercício de calibração de análise interlaboratorial, alertando para a problemática do consumo de drogas de abuso (THOMAS et al., 2012). Essa abordagem (já bem estabelecida) já investigou o esgoto de mais de 60 milhões de pessoas de 37 países entre os anos 2011-17 (GONZÁLEZ-MARIÑO et al., 2020). Conhecida a relação entre COC, BE e esgotos, ressalta-se que o índice de 52 % de coleta de esgotos no Município do Rio de Janeiro (MRJ) demonstra o potencial de contaminação de lagos e rios por contaminantes como drogas de abuso (IBGE, 2010; SNIS, 2015). Como exemplo, podem ser citados os Rio Meriti e o Canal do Mangue, ambos considerados precários quando ao monitoramento do índice de qualidade de água (IQA) (INEA, 2019a).

Além da detecção ambiental, é importante avaliar se níveis ambientais de COC e BE afetam efetivamente os sistemas biológicos, uma vez que análises físico-químicas não possibilitam a distinção entre contaminantes inertes e contaminantes efetivamente capazes de afetar os sistemas biológicos (COSTA et al., 2008). Sabendo disso, o organismo *Danio rerio (zebrafish)* é consolidado como modelo em estudos farmacêuticos, bioquímicos e fisiológicos, além de apresentar homologia genética de 70-80 % com mamíferos (PETERSON *et al.*, 2008; ZHAO; HUANG; YE, 2015). O *zebrafish* possui vantagens como baixo custo de manutenção, pequeno porte e rápido desenvolvimento (ZHAO; HUANG; YE, 2015), além de sensibilidade à baixas concentrações de xenobióticos, sendo considerado uma ferramenta para a avaliação de efeitos não letais à nível celular (PAROLINI *et al.*, 2017).

Investigações sobre toxicidade e mecanismos de ação de COC e seus metabólitos em *zebrafish* são escassas e fragmentadas na literatura, podendo ser encontrados poucos trabalhos

sobre efeitos de concentrações ambientais de COC e BE (ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$) nesses organismos (DE FARIAS ARAUJO et al., 2023). Europa e América do Norte representam o principal foco de estudos com *zebrafish* e COC, reforçando a necessidade da ampliação do conhecimento sobre os efeitos (em organismo não-alvo) de concentrações ambientais associadas à América Latina. Esse fato é corroborado pela pouca quantidade de estudos ambientais abordando drogas de abuso no Brasil, conforme endossado pelo trabalho de revisão da literatura publicado por Montagner, Vidal e Acayaba (2017), o qual indicou que menos de 10 % dos 58 trabalhos (brasileiros) levantados, correspondeu a estudos com drogas de abuso.

Diante do exposto, pretende-se avaliar a ocorrência de COC e BE em água superficial de rios na área da Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara. Além disso, pretende-se avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos níveis ambientais de COC e BE sobre embriões do organismo modelo *Danio rerio*, analisando-se efeitos morfológicos e teratogênicos (*Fish Embryo Acute Toxicity Test* – OECD 236/2013), e sobre o *Danio rerio* adulto, pela modulação de biomarcadores oxidativos e antioxidantes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ocorrência de COC e BE em rios urbanos na Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara e efeitos ecotoxicológicos no organismo modelo *Danio rerio* (embriões e adultos).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a modulação dos parâmetros físico-químicos temperatura, pH, salinidade, condutividade, nitrogênio amoniacal e demanda química de oxigênio, ao longo em rios urbanos da Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara;
- Avaliar a ocorrência de cocaína (COC) e benzoilecgonina (BE) em rios urbanos da Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara;
- Avaliar os efeitos morfológicos e teratogênicos de COC e BE em embriões de *Danio rerio* conforme adaptação do protocolo *Fish Embryo Toxicity Test*;
- Avaliar os níveis de biomarcadores do sistema antioxidante no fígado e cérebro de *zebrafish* adultos expostos à COC e BE.
- Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no fígado e cérebro de *zebrafish* adultos expostos à COC e BE.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. COCAÍNA E A SAÚDE PÚBLICA

3.1.1. Apresentação geral

A COC, um alcalóide tropânico, é conhecida como uma droga de abuso do tipo estimulante, produzida a partir da folha de coca (*Erythroxylon coca*) ou, em alguns casos, a partir da ecgonina e derivados (DOCIMO et al., 2012; NIDA, 2016). Segundo o *National Institute on Drug Abuse* (NIDA), o composto químico purificado foi obtido a partir das folhas de *Erythroxylon coca* há mais de 100 anos, sendo utilizado em tônicos para tratamento de doenças e por cirurgiões para arrefecimento da dor antes da evolução dos anestésicos sintéticos locais (NIDA, 2016).

A extração de COC das folhas de coca pode ser relacionada ao uso de solventes orgânicos como querosene e gasolina, bem como à bases inorgânicas como CaO e Na₂CO₃, ou ainda, à ácidos como o H₂SO₄ e HCl (MAGALHÃES et al., 2013). Em seguida, a pasta obtida é diluída em H₂SO₄ e tratada comumente com solução contendo KMnO₄, visando oxidar impurezas, produzindo a versão refinada sólida denominada base de COC, com maior valor agregado em mercados ilícitos (MAGALHÃES et al., 2013).

Duas diferentes formas químicas de COC são utilizadas por usuários, a forma sal hidrossolúvel (cloridrato de cocaína) e a forma insolúvel em água, conhecida como base de cocaína (crack, *freebase*)¹ (NIDA, 2016). O termo crack é originário dos EUA, a partir do som associado ao processo de queima para sua obtenção. Já no Brasil, o termo crack é comumente referido à todas as versões de cocaína fumada (FUKUSHIMA et al., 2014). O crack consumido no Brasil seria produzido diretamente a partir da pasta de COC, obtida após a extração das folhas (FUKUSHIMA et al., 2014), em detrimento da também conhecida produção a partir do processamento do sal cloridrato, utilizando amônia ou bicarbonato de sódio e água, seguindo-se o aquecimento (NIDA, 2016).

Além da diferenciação nas propriedades físicas [e químicas] entre a formas sal e base (crack, *freebase*) (CUBO, 2014), segundo publicado pela *Encyclopedia of Toxicology* em 2014, os adulterantes seriam uma das principais causas da toxicidade de COC, podendo ser citado o exemplo do fármaco levamisol, presente em mais de 80 % da COC apreendida nos EUA (SIEGRIST; WIEGAND, 2014). Uma vez associado à cocaína

¹ Segundo (UNODC, 2018a), “pasta de coca” é o nome conferido ao extrato das folhas de coca, correspondendo a um estágio intermediário. A purificação da pasta de coca resulta na cocaína (base e cloridrato), a qual é consumida pelo usuário.

adulterada, o levamisol pode causar vasculite cutânea ou agranulocitose (SIEGRIST; WIEGAND, 2014).

Tendo em vista aspectos de toxicidade associados, deve-se levar em conta também a forma de administração utilizada pelo usuário. A administração na forma sal pode ocorrer por via intranasal (insuflação nasal), oral, ou intravenosa. Já a forma base de COC (crack, *freebase*) é administrada por inalação de fumaça pelos usuários (CUBO, 2014; NIDA, 2016).

3.1.2. Toxicocinética da cocaína

Quando inalada em pó, a COC é absorvida pelos tecidos nasais, chegando à corrente sanguínea. O consumo oral ocorre quando o usuário esfrega a COC em suas gengivas (NIDA, 2016). A via intravenosa se dá por meio da administração de COC diluída em água, atingindo diretamente a corrente sanguínea, provocando uma maior intensidade dos efeitos da droga (NIDA, 2016). Já com a inalação de fumaça a partir da versão torrão (crack), a COC alcança os pulmões do usuário, onde é absorvida para a corrente sanguínea tão rapidamente quanto pela forma injetada (NIDA, 2016). Quando insuflada (insuflação nasal), a COC é capaz de atingir sua concentração máxima circulante em cerca de 1 hora, enquanto na forma fumaça inalada, a concentração máxima é observada após alguns minutos e, se injetada, observada quase imediatamente, com duração de efeitos agudos entre 2-4 h (ZYOUND *et al.*, 2017).

Segundo Moolchan *et al.* (2000), a COC é eliminada rapidamente do organismo humano (35-90 minutos) quando administrada sozinha em baixas doses. Entretanto, a eliminação de COC e seus metabólitos pode ser prolongada conforme aumento da dose e consumo crônico, indicando que a meia vida de COC e seus metabólitos pode apresentar-se diferente entre usuários ocasionais e regulares (MOOLCHAN *et al.*, 2000).

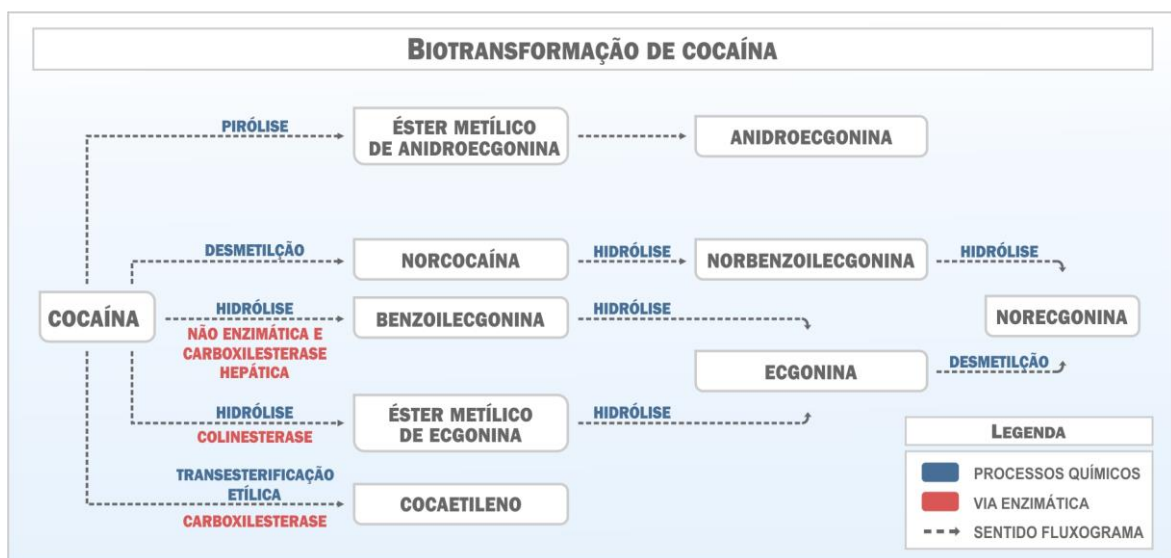
A cocaína é rapidamente eliminada da circulação sanguínea pela absorção nos tecidos, metabolismo e excreção (CONE *et al.*, 1998). Principalmente metabolizada no fígado, a COC é excretada amplamente pela urina, 1-9 % sob forma inalterada, restando a excreção de metabólitos, sendo a benzoilecgonina o principal (35-54 %), seguido do éster metílico de ecgonina com 32-49 % e norcocaína, representando cerca de 5 % (FONTES *et al.*, 2019; GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015; MOOLCHAN *et al.*, 2000; PAROLINI *et al.*, 2017). A EME é, por vezes, produzida em maior quantidade que a BE nos casos de COC enquanto fumaça inalada (CONE *et al.*, 1998).

Em estudo com humanos realizado por Cone *et al.* (1998), a exposição à COC pelas vias intravenosa, insuflação nasal e inalação de fumaça, resultou em um análise de urina correspondendo respectivamente às concentrações de 39, 30 e 16 % para BE. Já as

concentrações combinadas de EME e seis outros metabólitos de menor proeminência (norcocaína, benzoilnoregonina, *m*-hidroxicocaína, *p*-hidroxicocaína, *m*-hidroxibenzoilecgonina e *p*-hidroxibenzoilecgonina) corresponderam à 18, 15 e 8 %. (CONE *et al.*, 1998).

Os processos de transformação de cocaína em seus metabólitos são conhecidos (Figura 1). A COC pode sofrer hidrólise gerando BE, sofrer transesterificação pela enzima hepática cocaína carboxilesterase, gerando cocaetilenos (quando consumida com etanol), sofrer hidrólise por esterases hepáticas ou séricas, gerando EME, e desmetilação por uma oxidase hepática de função mista, gerando a norcocaína (CONE *et al.*, 1998). Além desses metabólitos principais, a éster metílico de anidroecgonina é destacada como resultado da pirólise da COC quando fumada (CONE *et al.*, 1998).

Figura 1: Fluxograma dos processos de transformação de cocaína.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de MORISHIMA; WHITTINGTON (1995); PAVLOVA *et al.* 2004).

3.1.3. Toxicodinâmica da cocaína

O mecanismo de ação de COC atua nos sistemas nervosos central e periférico, com o aumento da atividade do neurotransmissor de monoamina (dopamina, norepinefrina e serotonina) e afetando a recaptação pré-sináptica desses neurotransmissores (CUBO, 2014). Em uma situação de normalidade, a dopamina é liberada na sinapse pelo neurônio, onde é ligada a proteínas receptoras de dopamina no neurônio vizinho e a proteínas transportadoras, que reciclam a dopamina para uso posterior (NIDA, 2016). No entanto, a COC age sobre a liberação

de dopamina das vesículas sinápticas (principal efeito sináptico de COC) e ligando-se ao transportador de dopamina (DAT), bloqueando a recaptação de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos, fazendo que esta acumule na sinapse, produzindo um sinal amplificado aos neurônios receptores (NIDA, 2016; CUBO, 2014; TRIFILIEFF; MARTINEZ, 2014). Este fato é o causador da euforia experimentada pelo usuário, levando o vício em COC a ser conhecido como uma doença do sistema de recompensa de dopamina no cérebro (NIDA, 2016; CUBO, 2014). Embora a COC tenha uma afinidade semelhante aos diferentes transportadores de monoamina, os desfechos comportamentais associados ao vício são atribuídos principalmente aos efeitos de COC sobre a dopamina (TRIFILIEFF; MARTINEZ, 2014). Além dessa, uma segunda ação de COC seria no bloqueio de canais de sódio, o qual é responsável por seu efeito anestésico (CUBO, 2014).

Devido à ação de COC como estimulante do sistema nervoso, seu consumo pode acarretar sintomas como do estado de euforia, irritabilidade, ansiedade, inquietação, reduções de apetite e problemas do sono, vasoconstricção, dilatação de pupilas, aumento da temperatura corporal, batimentos cardíacos e pressão arterial (AGHAZADEH TABRIZI, 2017; NIDA, 2016). Alguns desses sintomas estariam ligados à uma exposição repetida à COC, conforme a adaptação do cérebro, resultando em uma menor sensibilidade do sistema de recompensa à estímulos naturais (NIDA, 2016). Com esse aumento da tolerância devido ao uso regular, maiores e mais frequentes doses são necessárias para que o usuário tenha a mesma sensação de prazer e alívio da abstinência, a qual é influenciada pelo aumento da sensibilidade à estresse, piorando o humor do usuário (NIDA, 2016). Alguns usuários desenvolvem sensibilidade, na qual ansiedade, convulsões e outros efeitos tóxicos são associados a menores quantidades de COC (NIDA, 2016). Além desses efeitos, diversos agravos podem ser acometidos à saúde do usuário de COC – descritos abaixo.

3.1.4. Agravos à saúde

Doses não fatais de COC podem acarretar problemas de saúde como insuficiência renal, convulsões, deficiência cognitiva (UNODC, 2018b). A COC é conhecidamente capaz de causar arteriosclerose, taquicardia, hipertensão, hemorragia intracraniana e, no caso de exposição pré-natal, descolamento prematuro da placenta, baixo peso ao nascer, possibilidade de cérebro menor que o normal, anormalidades no fígado, pulmões, órgãos genitais e sistema cardíaco, déficits cognitivos, déficits de atenção visual e disfunções coliculares como baixa memória visual (MERSEREAU *et al.*, 2016; BARRETO-VALER *et al.*, 2012; RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015; ZYOUND *et al.*, 2017).

A overdose de COC pode levar o usuário à morte. A tolerância e a sensibilização do usuário pelo consumo recorrente podem aumentar o risco de overdose (NIDA, 2016). Aproximadamente 50 % dos usuários de COC em 2016 já teriam testemunhado uma situação de overdose pelo menos uma vez na vida e cerca de um a cada seis teriam experimentado um episódio de overdose não fatal no ano anterior (UNODC, 2018b). Uma vez vivida a experiência de overdose de COC, os riscos de overdose fatal subsequente aumentam, tornando-se maiores a cada episódio não fatal (UNODC, 2018b). Além dos riscos de fatalidade para usuários diretos, a COC é conhecidamente capaz de aumentar os riscos de aborto, natimortos e nascimentos prematuros, uma vez que pode traspasar facilmente a barreira placentária (BARRETO-VALER *et al.*, 2012). Como é observado para os demais psicoestimulantes, o quadro de intoxicação por COC é alarmante uma vez que não há tratamentos farmacológicos estabelecidos contra transtornos devido a seu consumo (UNODC, 2018b).

3.1.5. Dados de consumo

Segundo o *World Drug Report 2020* das Nações Unidas, os dados de uso de cocaína no ano anterior têm aumentado desde 2011, alcançando 19 milhões de usuários no mundo em 2018 (UNODC, 2021a). Esse fato condiz com o pico de produção mundial de 1723 toneladas de cocaína estimado em 2018, representando um aumento de 4,6 % em relação ao ano anterior e de 100 % no período de 2014-18 (UNODC, 2021b). O relatório enfatiza também o crescente uso de cocaína no ano anterior na Europa Central e Ocidental, demonstrado por meio da detecção do principal metabólito da cocaína (benzoilecgonina) em esgoto, indicando o aumento de 50 % entre os anos de 2011-18, por meio da detecção do metabólito benzoilecgonina em esgoto (UNODC, 2021a). Já o Brasil, é apontado como o principal mercado de cocaína da América do Sul, com quase 1,5 milhões de usuários (UNODC, 2021a). A pandemia de COVID-19 teria influenciado nos casos de morte decorrentes do uso de cocaína, com aumentos registrados a partir de 2019 (UNODC, 2023). Por sua vez, o estado do Rio de Janeiro é considerado o 5º principal em casos de morte decorrentes do consumo de cocaína no Brasil, após os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais, respectivamente (UNODC, 2023).

O Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas (OBID) publicou em seu relatório sobre consumo de drogas de abuso, que aproximadamente 2,9 % dos entrevistados de 108 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes, já experimentaram cocaína pelo menos uma vez. O perfil destes 2,9 % dos entrevistados, estaria principalmente representado por homens, pela faixa etária de 25-34 anos e principalmente pela região sudeste do Brasil, a qual

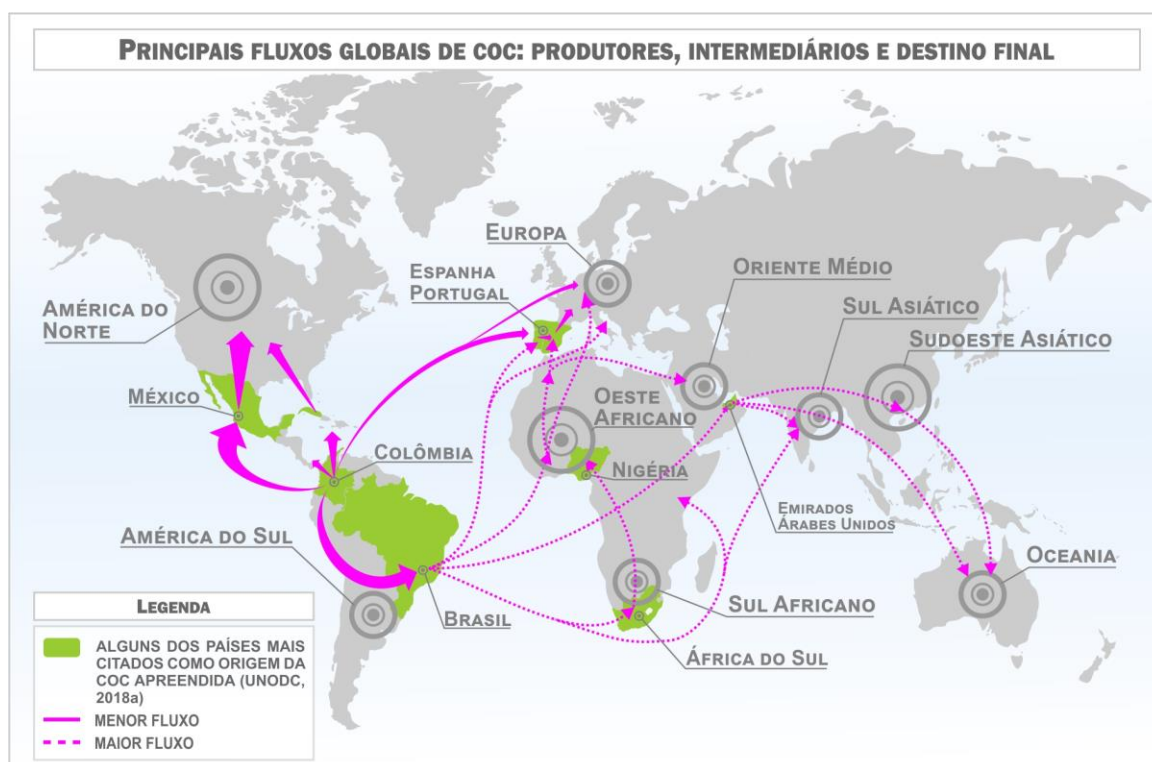
apresentou a maior prevalência (3,9 % dos entrevistados) do *uso na vida* de cocaína em relação às demais regiões (OBID, 2009). Em estudo realizado em 2012, o Levantamento Nacional de Álcool e Drogas publicou que cerca de 316.040 adolescentes e 5.131.954 adultos já haviam consumido COC uma vez na vida, além da marca de aproximadamente 225 mil adolescentes e 2 milhões de adultos, representando os que teriam feito uso de COC nos últimos 12 meses (LENAD, 2012).

3.1.6. Dados de apreensão

Adulterantes e diluentes são geralmente adicionados à COC enquanto droga de abuso, seja com o objetivo de disfarçá-la ante à detecção por autoridades, aumentar efeitos de euforia, ou diluir para venda ao usuário (SIEGRIST; WIEGAND, 2014). Após sua mistura com substâncias não psicoativas como talco, amido de milho, farinha ou bicarbonato de sódio, por vezes é também adicionada de outras drogas como anfetamina, ou fármacos como a procaína e o levamisol (NIDA, 2016; SIEGRIST; WIEGAND, 2014).

Os dados de apreensão de COC em 146 países compuseram o relatório intitulado *Drug Markets*, publicado pela *Nations Office on Drugs and Crime* das Nações Unidas em 2018 (UNODC, 2018a). A Figura 2 mostra o mapa dos principais fluxos globais de COC.

Figura 2: Mapa dos principais fluxos globais de COC.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de UNODC, 2018a).

Os dados de apreensão sugerem que a rota do mercado mundial de COC se origina principalmente nos países Andinos, com destino aos principais mercados, América do Norte e Europa (UNODC, 2018a). A principal rota é identificada como da Colômbia para os EUA, notadamente praticada via Oceano Pacífico (80 %), aportando diretamente via oceano, ou primeiro na América Central e México, atravessando a fronteira para os EUA por caminhão ou barcos (UNODC, 2018a). A segunda principal rota seria o aporte de COC na Europa, com origem na Colômbia, correspondendo a 20 % das menções como o país de origem da COC apreendida na Europa em 2016, deixando o segundo lugar para o Brasil, com 16 % das menções (UNODC, 2018a).

Além disso, o Brasil foi o país mais frequentemente mencionado como origem da COC interceptada em todas as sub regiões da África entre os anos 2012-17 e é indicado como o principal país de origem/transito de COC para a Ásia (2012-16), incluindo Cáucaso Sul, Oriente Médio e Sudeste, Leste e Centro Asiáticos (UNODC, 2018a). O Brasil também é mencionado como um dos principais países de origem da COC interceptada na Oceania, juntamente com EUA, Chile, Argentina e Canadá (UNODC, 2018a).

Os dados de apreensão revelam a grande demanda mundial por COC enquanto droga de abuso, denotando uma larga produção para atender este mercado paralelo. A problemática de COC enquanto droga de abuso aponta para um problema de saúde pública demonstrado por meio de seus efeitos toxicológicos, os quais tornam-se mais alarmantes quando contrastados com dados de consumo e demanda mundiais. Além disso, a COC excretada, e seus metabólitos ativos, podem oferecer risco enquanto contaminante ambiental de corpos hídricos - esta segunda problemática segue descrita abaixo.

3.2. COCAÍNA E O MEIO AMBIENTE

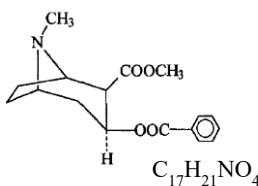
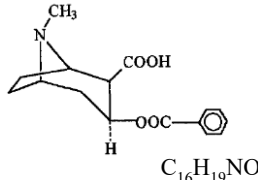
3.2.1. Detecção ambiental

O consumo de drogas de abuso tem provocado preocupações sociais e de saúde pública, porém também é capaz de resultar em impactos ambientais (FONTES *et al.*, 2019b). COC e seus metabólitos vêm sendo considerados como contaminantes de preocupação emergente nos ambientes aquáticos, uma vez que não integram programas de monitoramento governamentais quanto à sua ocorrência ambiental (FONTES *et al.*, 2019; JARDIM *et al.*, 2012). No entanto, contaminantes como COC e BE são candidatos a incrementar a legislação regulatória e programas de monitoramento governamentais, dependendo dos avanços no conhecimento de seus dados de detecção no ambiente, efeitos ecotoxicológicos

e à saúde humana e potencial de bioacumulação (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Tanto COC, quanto BE tendem a permanecer na coluna d'água, uma vez que apresentam $\log K_{ow}$ abaixo de 7 (Quadro 1), condizendo com a conhecida solubilidade do sal cloridrato de cocaína em água – contrastando com a baixa solubilidade da forma cocaína base (FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013). As moléculas de COC e BE são consideradas alcalinas (COC: $pK_a \approx 9$; BE: $pK_a \approx 10$), sendo BE uma espécie anfótera, com pK_a da função ácida ≈ 3 (FOULON *et al.*, 1999). As características de solubilidade de COC e BE permitem que ensaios de coleta e monitoramento de água sejam realizados de modo relativamente simples em diferentes matrizes.

Quadro 1: Características químicas de COC e BE.

Contaminante	CAS	Massa molar	$\log K_{ow}$	Pressão de vapor (25 °C)	pK_a (15 °C)
Cocaína					
	50-36-2	303,35 g mol ⁻¹	2,3 ^b - 3,08 ^a	1,91E-07 mm Hg	8,61 ^{ab} - 8,72 ^c
Benzoilecgonina					
	519-09-05	289,33 g mol ⁻¹	2,72	-	3,2 ^{ac} 10,1 ^{ac}

Obs.: Valores indicados pela letra "a" correspondem à referência Feitosa, Sodré e Maldaner (2013); Valores indicados pela letra "b" corresponde à referência NCBI (2021a; 2021b). Valores indicados pela letra "c" correspondem à referência Foulon *et al.* (1999).

COC e seus metabólitos vêm sendo detectados ao redor do mundo nos ambientes aquáticos (Quadro 2), principalmente pela excreção urinária (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2009; PRINZLEVE *et al.*, 2004), aportando continuamente, através de efluentes de ETEs e/ou despejo ilegal de esgotos em corpos hídricos, podendo acarretar efeitos ainda pouco conhecidos sobre a biota (FONTES *et al.*, 2019). Dessa forma, embora o aporte via ETE venha sendo considerado a principal via de acesso de COC e BE nesses ambientes ao redor do mundo, uma vez que as estações de tratamento vêm apresentando ineficácia em sua remoção (FONTES *et al.*, 2019; PAROLINI *et*

al., 2017), corpos hídricos desassociados de ETEs teriam esgotos clandestinos como principal aporte de COC.

Quadro 2: Alguns estudos de detecção ambiental de COC e BE ao redor do mundo.

Matriz	Conta- minante	Concentração (ng L ⁻¹)	Observação	Autor	Ano	Local			
Águas superficiais	BE	123,0	-	Kasprzyk-Hor- dern; Dinsdale; Guwy	2008	Reino Unido			
Afluente de ETE	COC	693,0	Domingo	Van Nuijs <i>et al.</i>	2009	Bélgica			
		158,0	Quarta-feira						
	BE	2130,0	Domingo						
		350,0	Quarta-feira						
Águas superficiais	COC	115,0	-	Metcalf <i>et al.</i>	2010	Canadá			
	BE	520,0	-						
Afluente de ETE	COC	823,0	-						
	BE	2664,0	-						
Efluente de ETE	COC	530,0	-						
	BE	775,0	-						
Afluente de ETE	COC	1200,0	-				Bijlsma <i>et al.</i>	2014	Espanha
	BE	2700,0	-						
Águas superficiais	COC	34,2	-	Mastroianni <i>et al.</i>	2016	Espanha			
	BE	129,0	-						
Afluente de ETE	COC	295	-	Asimakopoulos <i>et al.</i>	2017	EUA			
	BE	1070	-						
Efluente de ETE	COC	26,9	-						
	BE	435	-						
Águas superficiais	BE	6,4	-	Foppe; Ham- mond-Weinber- ger; Subedi	2018	EUA			
Afluente de ETE	COC	160	Dia comum						
	BE	987							
	COC	197	Dia nacional de independência						
	BE	959							
	COC	201	Durante eclipse solar						
	BE	1200							
Esgoto bruto	COC	3,7	-	Daglioglu; Gu- zel; Kilercioglu	2019	Turquia			
	BE	99	-						
Esgoto bruto	BE	29,0	-	Sulej-Sucho- mska <i>et al.</i>	2020	Polônia			
Esgoto bruto	COC	460,0	-	Watanabe <i>et al.</i>	2020	EUA			
	BE	2570,0	-						
Águas superficiais	COC	134,0	-						
	BE	53,0	-						

Águas superficiais	COC	24,6	-	Kondor <i>et al.</i>	2020	Hungria
	BE	43,9	-			
Águas superficiais	COC	0,3	-			
	BE	1,2	-			
Água de abastecimento	BE	0,2	-	Karki <i>et al.</i>	2020	Suécia
Afluente de ETE	COC	137	-	Styszko <i>et al.</i>	(2021)	Polônia
	BE	82	-			
Afluente de ETE	COC	1096	Inverno	Verovšek <i>et al.</i>	(2023)	Eslovênia
	BE	2644				
	COC	1008	Verão			
	BE	2544				
Efluente de ETE	COC	8,28	Inverno			
	BE	46,4				
	COC	4,22	Verão			
	BE	24,8				
Águas superficiais	COC	1,58	Inverno			
	BE	6,06				
	COC	2,68	Verão			
	BE	9,66				

Por sua vez, COC e BE também vêm sendo detectadas em matrizes ambientais no Brasil (Quadro 3). Montagner, Vidal e Acayaba (2017) enfatizam em seu trabalho de revisão uma escassez de estudos brasileiros sobre o tema, identificando apenas 58 artigos presentes em revistas indexadas, correspondentes à ocorrência de contaminantes emergentes em matrizes aquáticas brasileiras e discussão sobre seus efeitos biológicos. Desses 58 trabalhos, menos de 10 % corresponderam à investigações sobre drogas de abuso (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Apesar do relatado por Montagner, Vidal e Acayaba (2017) e cenário de investigações sobre concentrações de COC e BE em matrizes ambientais vem crescendo desde sua publicação em 2017 (Quadro 3). No entanto, dentre os trabalhos de investigação de COC e BE no Brasil, nenhum foi realizado no Rio de Janeiro, concentrando-se principalmente em São Paulo e no Distrito Federal.

Quadro 3: Alguns estudos de detecção ambiental de COC e BE no Brasil.

Matriz	Conta- minante	Concentração (ng L ⁻¹)	Observação	Autor	Ano	Local
Esgoto bruto ETE 1	BE	4297,0	-	Silva	2012	DF - Brasil
	COC	1080,0	-			

Esgoto bruto ETE 2	BE	3404,0	-	Pereira <i>et al.</i>	2016	SP -Brasil
	COC	1260,0	-			
Água do mar	COC	400,5	-	Pereira <i>et al.</i>	2016	SP -Brasil
Sedimento marinho	COC	537,0	-			
Águas de abastecimento	COC	530,0	inverno	Shihomatsu <i>et al.</i>	2014	SP - Brasil
	BE	139,0	inverno			
	COC	261,0	verão			
	BE	42,0	verão			
Águas superficiais	COC	62,0	-	Campestrini & Jardim	2017	SP - Brasil
	BE	1019,0	-			
Águas de abastecimento	COC	22,0	-	Shihomatsu <i>et al.</i>	2017	SP -Brasil
	BE	652,0	-			
Águas superficiais	COC	2650,0	-	Shihomatsu <i>et al.</i>	2017	SP -Brasil
	BE	139,0	-			
Afluente de ETE	COC	1175,0	Terça-feira	Da Silva <i>et al.</i>	2018	DF - Brasil
	BE	2374,0				
	COC	1983,0	Domingo			
	BE	8559,0	Carnaval			
Esgoto bruto	COC	1260	-	Sodré <i>et al.</i>	2018	DF - Brasil
	BE	4297	-			
Água do mar	COC	203,6	-	Fontes <i>et al.</i>	2019	SP - Brasil
	BE	38,6	-			
Desague de galeria urbana no mar	COC	30,3	-	Roveri <i>et al.</i>	2020	SP - Brasil
	BE	278	-			
Água do mar	COC	12,52	-	Fontes <i>et al.</i>	2021	SP - Brasil
	BE	28,53	-			
Desague de galeria urbana no mar	COC	1,7	-	Roveri <i>et al.</i>	2021	SP - Brasil
	BE	4,8	-			
Água do mar	COC	0,17	-	Pisetta <i>et al.</i>	2022	SC - Brasil
	BE	1,1	-			
Afluente de ETE	COC	867,2	Carnaval	Sodré <i>et al.</i>	2022	DF - Brasil
	BE	3680				
	COC	943	Final de Semana			
	BE	2238	Quinta-feira			
	COC	711,9	Quinta-feira			
	BE	1812				

As concentrações de COC e BE em águas provenientes de ETE podem variar conforme o tipo de sistema de tratamento, índices pluviométricos (efeito de diluição) e estação do ano (FONTES *et al.*, 2019; MACKULAK *et al.*, 2019b). Somados a esses fatores, concentrações

ambientais de COC podem também variar conforme diferenças de consumo em finais de semana versus dias úteis e feriado de carnaval no Brasil (DA SILVA *et al.*, 2018). A ocorrência de eventos, como dia nacional da independência nos EUA e durante observação de eclipse solar, também têm demonstrado influência sobre as concentrações monitoradas (FOPPE; HAMMOND-WEINBERGER; SUBEDI, 2018). De modo semelhante, diferenças entre dias de gêneros musicais em festivais de música na Eslováquia e República Tcheca foram relatadas como influentes sobre as concentrações de COC monitoradas (MACKULAK *et al.*, 2019a).

O monitoramento baseado em epidemiologia do esgoto (MBEE) tem demonstrado que, além da estimativa de consumo de COC por uma população (SODRÉ *et al.*, 2018), é possível identificar a existência de locais de refino clandestino, representados por altas concentrações de COC (FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013). A abordagem MBEE também fornece informações de dinâmicas de consumo juntamente com outras drogas de abuso, dinâmicas temporais e espaciais, estabilidade da substância alvo (SODRÉ *et al.*, 2018) e orientar autoridades para aplicação de políticas públicas (MALDANER *et al.*, 2012).

Há atualmente um esforço internacional de padronização de análises com amostras de esgoto. Desde 2010, o grupo *Sewage analysis CORE group — Europe (SCORE)* vem ganhando proeminência na padronização do monitoramento por meio de um exercício de calibração interlaboratorial, alertando para a problemática do consumo de drogas de abuso (THOMAS *et al.*, 2012). A partir dessa abordagem, o esgoto de mais de 60 milhões de pessoas de 37 países foi analisado entre os anos 2011-17 (GONZÁLEZ-MARIÑO *et al.*, 2020). Castiglioni *et al.* (2013) publicaram um dos primeiros trabalhos relacionados à essa abordagem interlaboratorial do *SCORE*, visando reduzir a incerteza associada ao consumo de drogas de abuso por uma população. Fatores como temperatura de transporte da amostra, temperatura de armazenamento e diminuição do pH, têm sido abordados nas publicações do *SCORE*. Trabalhos como o de Baker *et al.* (2012) colaboraram para a noção mais realista das concentrações de COC e BE monitoradas, observando que menos de 5% de COC e de BE (0,9-3,1 % para COC, 0,3-0,5 % para BE) estaria agregado ao material particulado em amostras de água afluyente de ETE.

Segundo o *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA, 2016)*, após coleta, as amostras são comumente armazenadas à 4 °C, porém alerta que COC e EME não são estáveis à pH 7,5. A esse respeito, Feitosa, Sodré e Maldaner (2013) explicam que a refrigera o de amostras de esgoto à 4 °C não garante necessariamente as estabilidade dos analitos, devido à alta atividade biológica associada à matriz ambiental. Além disso, a concentra o de BE pode aumentar em até 20 % em 24 h à 4 °C em amostras compostas, pela hidrólise de COC (EMCDDA, 2016). Por isso, a acidifica o das amostras (pH 2) tem sido

recomendada como forma de prevenção à “formação” de BE (EMCDDA, 2016; POSTIGO; LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2008). O EMCDDA (2016) acrescenta que as estratégias mais aplicadas pela literatura seriam o congelamento das amostras após coleta (-20 °C) ou o processo de extração em fase sólida para cartuchos, em até 12 h após coleta.

Quanto às estratégias para o tipo de coleta, pode-se citar o trabalho de revisão publicado por Feitosa, Sodr e e Maldaner (2013), no qual foram listados 56 artigos de análise de drogas de abuso. Segundo os autores, a matriz esgoto   geralmente coletada via amostragem composta ou acumulada (geralmente de 24 h), enquanto para as matrizes água subterrânea, superficial e abastecimento, a principal abordagem tem sido amostragem simples (instantânea). Segundo os autores, a etapa de preparo das amostras para determinação geralmente corresponde   pr -concentração e/ou *clean up* baseada em extração de fase sólida (SPE) (FEITOSA; SODR E; MALDANER, 2013). Dentre os adsorventes mais empregados na extração de drogas de abuso, podem ser destacados os baseados em copolímeros com características hidrofílicas e hidrofóbicas, como os cartuchos Oasis HLB[®] (Waters), sendo empregado em 50 % dos trabalhos de detecção de COC e/ou BE listados (FEITOSA; SODR E; MALDANER, 2013). Uma menor proporção de trabalhos empregariam técnicas baseadas em extração passiva (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*) na detecção de drogas de abuso, assim como baseadas na injeção direta no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) ou de ultraefici ncia (UPLC) acoplados   espectr metros de massas (FEITOSA; SODR E; MALDANER, 2013).

As técnicas de cromatografia líquida acoplada   espectrometria de massas tipo triplo quadrupolo (HPLC e UPLC-MS/MS), utilizando duas etapas de espectrometria de massas para o monitoramento de íons específicos e seus fragmentos, vêm despontando na detecção de drogas de abuso, correspondendo a 70 % dos 56 trabalhos listados por Feitosa, Sodr e e Maldaner (2013). O emprego dessas técnicas de separação reduziria interferências decorrentes de substâncias inerentes   matriz, além de contribuir para menores limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), devido   sua seletividade e sensibilidade (UNODC, 2011).

A detecção ambiental de COC e BE representaria um risco associado ao contato com águas contaminadas, seja na matriz esgoto ou em corpos hídricos, alarmando autoridades e sociedade civil ao redor do mundo (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017; EMCDDA, 2016; VAN NUIJS et al., 2018). Dessa forma, as matrizes aquáticas brasileiras, e especificamente do estado do Rio de Janeiro, podem estar sujeitas aos riscos provenientes dessa contaminação.

3.2.2. Risco associado às matrizes aquáticas do Rio de Janeiro

Sabendo-se dos dados de detecção ambiental de COC e BE ao redor do mundo e no Brasil, destaca-se que não há estudos que investiguem a ocorrência destes contaminantes em nenhum município no estado do Rio de Janeiro (ERJ). Dessa forma, rios urbanos no Rio de Janeiro seriam alvos potenciais de investigações sobre a presença desses contaminantes.

Sposito et al. (2018), indicam que a principal fonte de aporte de contaminantes como COC e BE em corpos aquáticos seriam o despejo de esgoto sem tratamento, bem como estações de tratamento de esgoto (ETE) ineficazes em sua remoção. Embora no Brasil haja estudos como o de SODRÉ *et al.*, (2018), o qual investigou a ocorrência de COC e BE associados à captação em ETEs, deve-se atentar para o fato de a localidade investigada (Distrito Federal) apresenta índices de captação de esgotos acima de 70 %, permitindo a coleta de amostras representativas da população. Já o MRJ, apresenta um índice de 52 % de captação e de 52 % de tratamento, demonstrando que cerca de 44 % de todo o esgoto gerado no município estaria retornando aos corpos hídricos sem nenhum tratamento, apontando para a importância da investigação da matriz águas fluviais (SNIS, 2015).

Segundo dados publicados pelo IBGE (2010), cerca de 50 mil residências no MRJ direcionam esgoto de banheiros e sanitários para rios, lagos e mar, além da parcela da população que sequer possui banheiro ou sanitário (Quadro 4).

Quadro 4: Domicílios particulares permanentes por existência de banheiros e sanitários.

Banheiro			Sanitário			Não possuem banheiro/sanitário
Rede de esgotos	Fossa séptica	Rios, lagos e mar	Rede de esgotos	Fossa séptica	Rios, lagos e mar	
3.761.175	168.824	48.095	37.734	1.220	1.775	3.046

Fonte: IBGE (2010).

O MRJ está localizado entre duas Regiões Hidrográficas (RHs), a RH V (Baía de Guanabara) e a RH II (Guandu) (Figuras 3 e 4). Ambas apresentam respectivamente índices de 63 e 38 % de cobertura da rede de esgotos. No entanto, a RH II desponta como a pior RH do ERJ, apresentando apenas 2 % de índice de esgotos tratados (PERHI-RJ, 2014).

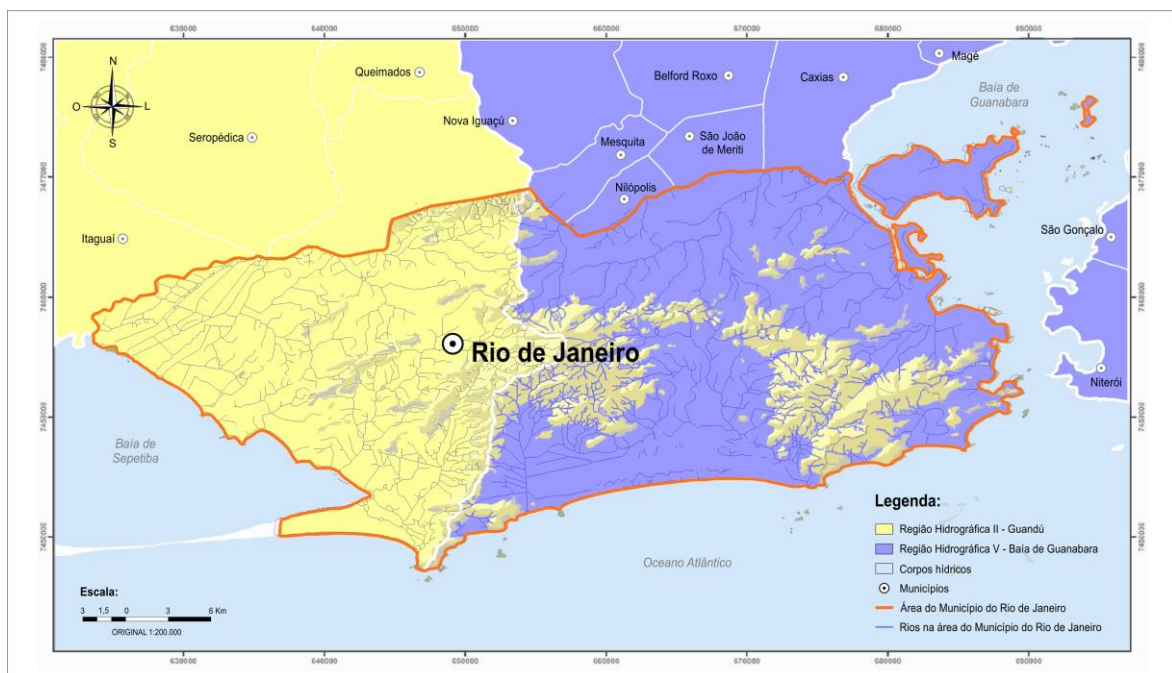
Figura 3: Regiões hidrográficas do estado do Rio de Janeiro.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de PORTAL RIO.RJ, 2020).

Segundo o Portal INEA.RJ (2020), a RH II, em amarelo na Figura 4, apresenta problemas decorrentes do uso e ocupação do solo e gestão de recursos hídricos. De modo semelhante, a RH V, em azul na Figura 4, é conhecida por inúmeros corpos d'água em estágio avançado de degradação, devido em grande parte ao aporte de esgotos domésticos sem tratamento, o que se somaria ao fato de estar situada em uma região metropolitana densamente povoada com baixos níveis de tratamento de efluentes, acelerando a degradação ambiental (PORTAL INEA.RJ, 2020).

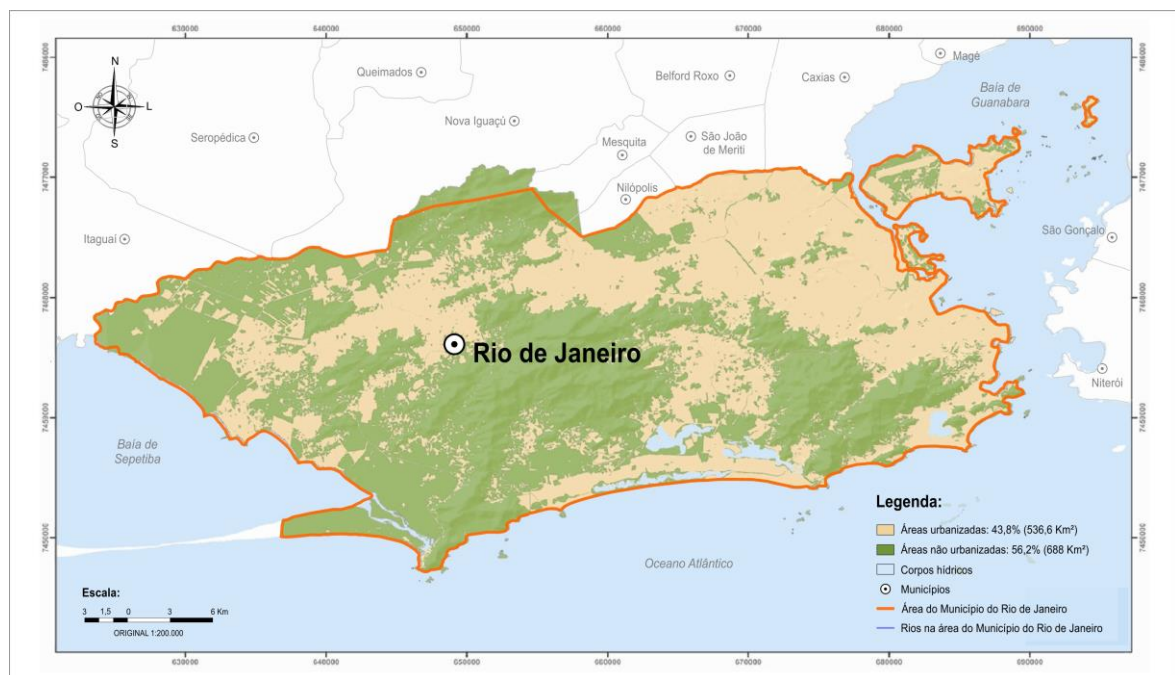
Figura 4: Mapa do MRJ dividido entre as RHs II-Guandu e V-Baía de Guanabara.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de PMSB, 2011).

Uma vez que o aporte de COC e BE nos corpos hídricos estaria associado a águas de esgotos (MALDANER et al., 2012), uma maior urbanização de uma área com baixa coleta e tratamento de esgotos poderia influenciar agravando o risco associado. Assim, cabe ser citado que o MRJ apresenta 43,8 % de áreas urbanizadas (536,6 km²), principalmente associada à RH V, e 56,2 % de áreas não urbanizadas (688 km²), principalmente associada à RH V (Figura 5) (PMSB, 2011). Com isso, 96,7 % população residente da RH II é considerada urbana, contra os 99,6% da RH V (IBGE, 2010).

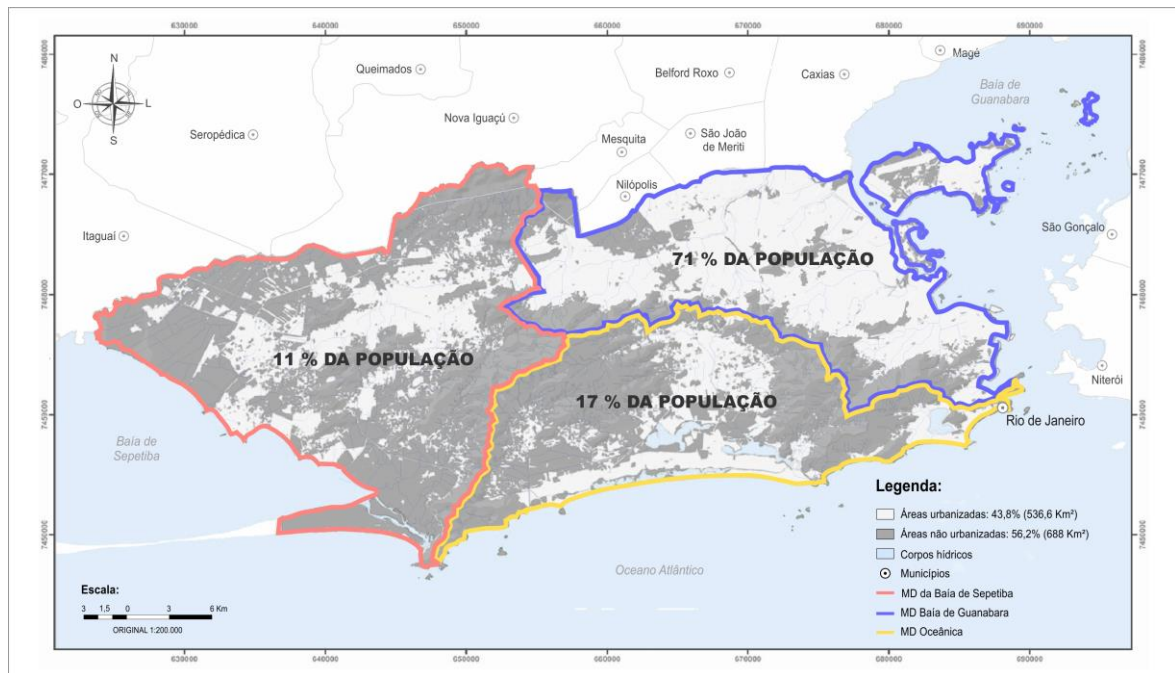
Figura 5: Áreas urbanizadas e não urbanizadas no Mapa do MRJ.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de PMSB, 2011).

O MRJ apresenta 267 rios, sendo grande parte descaracterizada por meio de obras de canalização, aterros e desvios de curso (PMSB, 2015). Esses rios drenam a água das chuvas conforme as 3 contribuições de drenagem principais da cidade: Macrorregião de Drenagem (MD) da Baía de Sepetiba, MD da Baía de Guanabara e MD Oceânica (Figura 6) (PMSB, 2015). As MDs do MRJ são delimitadas pelas formações montanhosas da cidade e o corpo hídrico receptor, separando zonas de baixada e delimitando a urbanização do município, que é principalmente observada na MD da Baía de Guanabara (71 % da população), seguida da MD Oceânica (17 %) e MD da Baía de Sepetiba (11 %) (PMSB, 2015). Este fato novamente aponta para a região das zonas Norte, Centro e Sul do MRJ como potencial para a contaminação de rios urbanos por contaminantes de esgoto como COC e BE.

Figura 6: Macrorregiões de Drenagem no Mapa do MRJ.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de PMSB, 2015).

Por sua vez, as 3 MDs do MRJ dividem-se em 48 sub-bacias hidrográficas (SBs), inseridas total ou parcialmente nos limites do município (Figura 7). O Plano municipal de Saneamento Básico do Rio de Janeiro (PMSB, 2015) aponta as SBs que merecerem atenção quanto à sua qualidade ambiental, podendo-se destacar:

- **SB do Canal do Mangue**
Na MD da Baía de Guanabara são observados rios sujeitos a variações de marés, podendo resultar em refluxo. O Canal no Mangue, localizado no bairro Leopoldina, é um exemplo desse efeito. Além da SB do Canal do Mangue, a MD apresenta outras SBs com rios degradados, como a SB do Canal do Cunha, do Rio Ramos, do Rio Sarapuí e a SB dos Rios Acari, Pavuna e Meriti.
- **SB dos Rios Acari, Pavuna e Meriti**
Também localizada na MD da Baía de Guanabara, a SB dos Rios Acari, Pavuna e Meriti é caracterizada por um elevado estágio de contaminação de seus corpos hídricos, sendo uma região de povoamento denso e zonas industriais, com aportes de detritos e esgotos em seus corpos hídricos.
- **SB de São Conrado**
Localizada na MD Oceânica, a SB de São Conrado comporta parte da favela da Rocinha, considerada a maior da América do Sul, e apresenta alterações que

descharacterizam o curso de seus rios, os quais são drenados principalmente pelo Canal de São Conrado, desaguando na praia de mesmo nome.

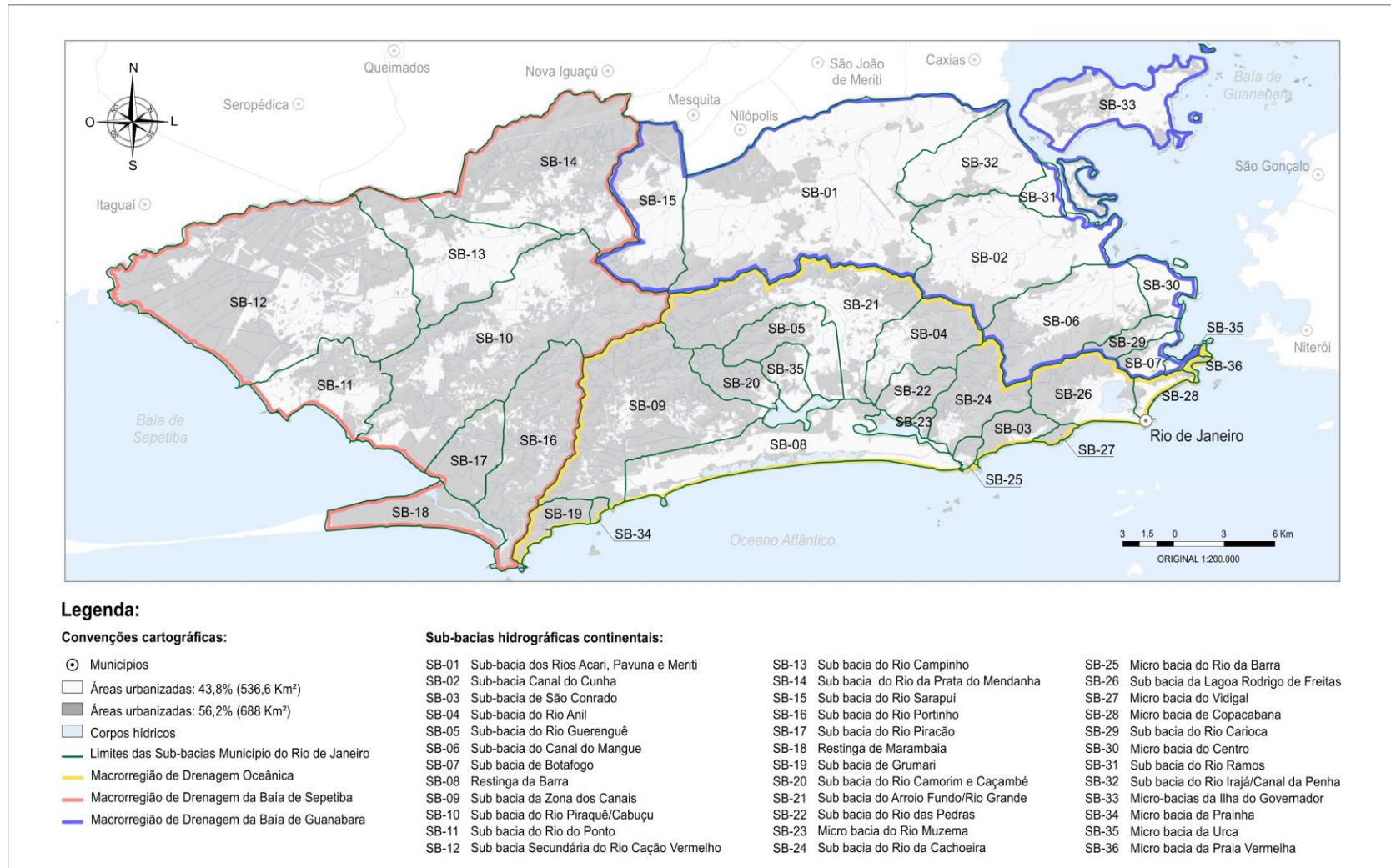
- SB do Rio Anil

Também localizada na Md Oceânica, apresenta o Rio Sangrador como o principal, o qual atravessa uma zona residencial, uma favela e uma área alagada, recebendo cargas de esgoto doméstico e desaguando na Lagoa do Camorim.

Somando-se à indicação de precariedade da qualidade ambiental das SBs, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA) realiza campanhas de monitoramento regulares em rios do MRJ, contudo, avaliando apenas fatores físico-químicos. Em boletim publicado em novembro de 2019 pelo INEA, o monitoramento dos corpos de água doce em estações de monitoramento na RH V indicou como muito ruim o índice de qualidade das águas (IQANSF) de todos os rios monitorados na área do MRJ (INEA, 2019a). Já o boletim que refere-se à RH II indicou que as águas dos rios monitorados na região foram qualificadas de média à muito ruim no ano de 2019 (Figura 8), conforme o mesmo índice (INEA, 2019b). O IQANSF, utilizado nos boletins do INEA, consolida em um único valor os resultados de 10 parâmetros: Oxigênio Dissolvido (OD), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Fósforo Total (PT), Nitrogênio Nitrato (NO₃), Potencial Hidrogeniônico (pH), Turbidez (T), Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), Temperatura da Água e do Ar e Coliformes Termotolerantes (INEA, 2019b).

Além disso, pode-se complementar o monitoramento dos boletins do INEA já citados com edições do relatório Observando os Rios, publicadas pela Fundação SOS Mata Atlântica (2019; 2020), nas quais são monitorados índices de qualidade de água (IQA) em diferentes corpos hídricos em bacias hidrográficas do bioma Mata Atlântica (Figura 8). Segundo a edição de 2019 do relatório, dados de monitoramento na RH V do MRJ avaliaram que aproximadamente de 70% dos 15 rios monitorados apresentaram IQA regular, enquanto

Figura 7: Macrorregiões de Drenagem no Mapa do MRJ.

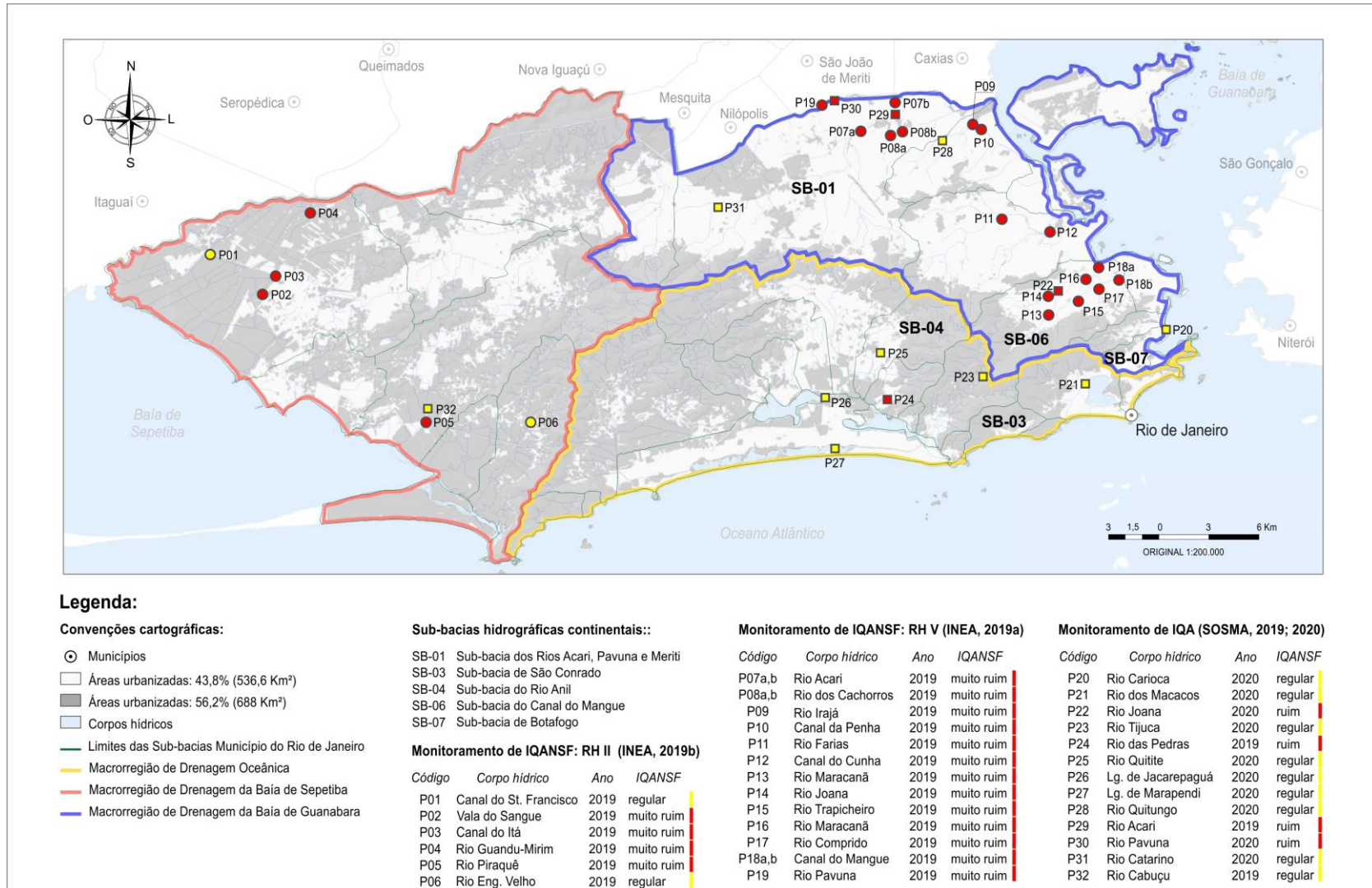


Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de PMSB, 2015).

os 30% restantes apresentaram IQA ruim. O relatório afirma também que estes índices têm se mantido de regular à ruim na área do MRJ pelos últimos 9 anos (SOS MA, 2019). Já na versão de 2020, cerca de 80% das amostras no MRJ apresentaram IQA regular, enquanto apenas 20% apresentaram IQA considerado ruim (Figura 8) (SOS MA, 2020). O Índice de Qualidade de Água (IQA) representa o principal índice de qualidade da água utilizado no país e é calculado pela avaliação conjunta de 16 parâmetros: temperatura da água, temperatura do ambiente, turbidez, espumas, lixo flutuante, odor, material sedimentável, peixes, larvas e vermes vermelhos, larvas e vermes brancos, coliformes totais, oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), potencial hidrogeniônico (pH), fosfato (PO₄) e nitrato (NO₃) (SOS MA, 2019).

Tanto o boletim do INEA (2019b) referente à RH II, quanto os relatórios supracitados da Fundação SOS Mata Atlântica (2019; 2020) não abordam os índices próprios ao aporte de águas de esgotos (presença de coliformes termotolerantes) nos corpos hídricos especificamente. No entanto, o boletim referente à RH V traz este detalhamento, indicando que todos 16 pontos de coleta amostrados excederam tanto os limites máximos para coliformes termotolerantes nos usos estabelecidos pela CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000), quanto nos usos estabelecidos pela CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). Destaca-se que o limite menos restritivo da legislação brasileira é de 4.000 coliformes termotolerantes (NMP/100 mL), entretanto os níveis desse parâmetro observados no boletim do INEA para a RH V variaram entre 540.000 e >1.600.000 NMP/100 mL (BRASIL, 2005; INEA, 2019b).

Figura 8: Monitoramento do Índice de Qualidade de Água no MRJ.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de INEA, 2019b, 2019a; SOS MA, 2019, 2020).

Uma vez observados os diferentes aspectos ambientais apontados anteriormente, segundo critérios de degradação potencial por aporte de águas de esgotos, destacam-se:

- Quanto ao índice de rede de coleta/tratamento de esgotos, destaca-se a MD da Baía de Sepetiba como a mais precária em relação às demais, indicando que, possivelmente suas águas fluviais teriam elevados índices de aporte de esgotos (PERHI-RJ., 2014).
- Já quanto à cobertura de área urbana, destaca-se a MD da Baía de Guanabara, a qual apresenta também duas das sub-bacias hidrográficas mais degradadas do MRJ segundo o PMSB (2015): Sub-bacia do Canal do Cunha e Sub-bacia dos Rios Acari, Pavuna e Meriti.
- Quanto ao índice monitoramento de qualidade de água, a partir da combinação de diferentes campanhas de monitoramento nos anos 2019-20, destaca-se a MD da Baía de Guanabara, com mais de 90% de seus pontos de monitoramento qualificados como ruim ou muito ruim, seguida pela MD da Baía de Sepetiba, com aproximadamente 60% dos pontos de coleta qualificados como muito ruins (INEA, 2019b, 2019a; SOS MA, 2019, 2020).
- Deve-se considerar também que, embora o PMSB (2015) não tenha apontado a Sub-bacia do Canal do Mangue como uma das mais degradadas da MD da Baía de Guanabara, esta apresenta 100% das amostras de seus 8 pontos de coleta classificados como águas de qualidade ruim ou muito ruim (P13-18, P22) (INEA, 2019a; SOS MA, 2020).
- Quanto à região da Zona Sul do MRJ, apesar de ter apresentado monitoramento com IQA regular, sua classificação pode tratar-se de uma subestimação do cenário, uma vez que é coberta por apenas dois pontos de coleta (P20 e P21), deixando-se de lado importantes vias de drenagem como o Rio Banana Podre no Bairro Botafogo e o Canal Visconde de Albuquerque no bairro Leblon, os quais são apontados como via de despejo de águas contaminadas com e esgoto (CHALEGRE-TOUCEIRA *et al.*, 2018; SOS MA, 2019, 2020).

Visto as características ambientais do MRJ segundo as áreas de maior potencial de poluição por esgotos domésticos associados à rios e canais, e observando-se que as 3 Macrorregiões de Drenagem apresentam locais previamente monitorados por diferentes instituições e classificados precários quanto à índices de qualidade de água, emerge a preocupação e a necessidade de monitoramento de contaminantes associados à esgoto (como

COC e BE), sobretudo, com avaliação de efeitos toxicológicos de concentrações ambientais sobre organismos não-alvo.

3.2.3. Ecotoxicologia de COC e BE: Efeitos sobre *zebrafish* (*Danio rerio*)

O cenário ambiental do MRJ aponta para um risco de contaminação de rios urbanos por contaminantes associados a esgotos domésticos. Entretanto, além da possibilidade de contaminação, seria necessário avaliar se níveis ambientais desses contaminantes (COC e BE) seriam capazes de causar efeitos adversos. O organismo modelo *Danio rerio* seria uma opção abrangente para os testes ecotoxicológicos com essas concentrações de COC e BE.

O peixe *Danio rerio*, conhecido como *zebrafish* (peixe zebra) ou paulistinha, vem sendo considerado como um organismo modelo consolidado nas áreas de farmacologia, bioquímica, genética, fisiologia e neurotoxicologia (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; PETERSON *et al.*, 2008). Essa ampla abordagem do uso de *zebrafish* na ciência estaria associada às vantagens do modelo, uma vez que apresenta homologia genética com mamíferos em torno de 70 %, pequeno porte, baixo custo de manutenção, rápido desenvolvimento (ZHAO; HUANG; YE, 2015) e sensibilidade para drogas de abuso (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014) e outros xenobióticos, mesmo em baixas concentrações, permitindo a avaliação de efeitos não leais, em nível celular (PAROLINI *et al.*, 2017). Os embriões e larvas de *zebrafish* apresentam ainda outras vantagens, proporcionadas pela alta taxa de fecundidade, rápida fecundação externa em ovos transparentes, (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014), rápido desenvolvimento extrauterino, formação da maioria dos órgãos após 24 hpf (h após fertilização), larvas já formadas para uso experimental em 3 dpf (dias após fertilização) e transparência das larvas até 7 dpf (ZHAO; HUANG; YE, 2015). Os embriões também são utilizados em ensaios de análises morfológicas, comportamentais, cardíacas, proteômicas (DE FARIAS ARAUJO *et al.*, 2023) e em teste padronizado de toxicidade, conforme o *Fish Embryo Acute Toxicity Test* (FET) publicado pela OECD 236/ 2013 (OECD, 2013).

Ainda há efeitos adversos relacionados à COC e BE necessitando de maiores investigações que favoreçam o entendimento de mecanismos moleculares e fisiopatológicos da dependência e abstinência, beneficiando o desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes (RILEY *et al.*, 2018), sobretudo, utilizando organismos modelo que provejam informações adicionais que contrastem com as limitações do uso de outros modelos (ex.: roedores) (MERSEREAU *et al.*, 2016). O organismo modelo *zebrafish* tem demonstrado alta sensibilidade à efeitos da administração de COC, bem como à seus metabólitos (RILEY, *et al.*, 2018; PAROLINI *et al.*, 2017). Apesar disso, até a presente data não há artigos de revisão da literatura

que abordem efeitos da exposição de *zebrafish* à COC e/ou seus metabólitos de forma ampla, sendo encontradas principalmente revisões relacionadas à efeitos neurocomportamentais (RIHEL; SCHIER, 2011; STEWART *et al.*, 2011a, 2011b). Em acréscimo, não há trabalhos de revisão sobre efeitos de concentrações ambientais de COC e seus metabólitos sobre *zebrafish*. Os trabalhos relacionados à ecotoxicologia de *zebrafish* expostos à COC investigam efeitos principalmente associados à abordagem de COC enquanto droga de abuso, utilizando concentrações na faixa de mg L⁻¹, enquanto uma minoria investiga COC e BE enquanto contaminantes ambientais (ng e µg L⁻¹), conforme apresentado nos Quadros 5 e 6.

Quadro 5: Abordagem droga de abuso - Substância testada, concentração / tempo de exposição empregados, organismo modelo, testes realizados e efeitos observados em estudos de COC e/ou BE sobre *zebrafish*.

Composto	Concentração / tempo de exposição	Organismo modelo	Testes realizados	Principais efeitos observados	País	Referência
Cloridrato de cocaína	1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 24 e 48 hpf	Embrião de <i>zebrafish</i> (5 hpf)	Expressão dos fatores de transcrição <i>ndr2</i> , <i>lmx1b.1</i> , <i>lmx1b.2</i> , <i>otpa</i> , <i>otpb</i> , <i>nurr1</i> e seus genes alvo (TH e DA)	Cocaína afetou a expressão gênica, alterações na distribuição espacial de <i>lmx1b.1</i> e <i>lmx1b.2</i> (24 e 48 hpf) e nos níveis de TH.	Espanha	Barreto-Valer, Lopez-Bellido e Rodriguez (2013)
Cloridrato de cocaína	1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 8, 16,24, 48 e 72 hpf	Embrião de <i>zebrafish</i> (5 hpf)	Expressão de receptores de dopamina e miR-133b	Redução da expressão de miR-133b. Alterações nos genes alvo de Pitx3 ao interagir com miR-133b.	Espanha	Barreto-Valer <i>et al.</i> (2012)
Cocaína	5,9-29,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 5 dias (CPP) ou 20 min (teste de locomoção)	<i>Zebrafish</i> adultos	Teste CPP (“ <i>conditioned place preference</i> ”) e de locomoção.	Preferência pelo lado contaminado e alterações no padrão de locomoção conforme aumento da concentração.	Inglaterra	Brock <i>et al.</i> , (2017)
Cocaína	1-15 mg L^{-1} (Teste CPP); 10 mg L^{-1} / 10 min (Teste VT)	<i>Zebrafish</i> adultos (geração F2 exposta) e geração F3	Teste CPP, Teste VT (Visual Threshold), Teste T-Maze	Indução de CPP nos peixes F2 à 5, 10 e 15 mg L^{-1} . Inibição parcial de F3 da adaptação ao escuro no teste VT. Redução da capacidade de aprendizado em F3.	EUA	Darland e Dowling (2001)
Cocaína	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ / 1 -2 dias (CPP), 1 hora (Expressão gênica)	<i>Zebrafish</i> machos adultos (6-8 meses)	Teste CPP; Expressão gênica	Indução de CPP; Aumento na expressão de tirosina hidroxilase (TH) e diminuição da expressão do fator de alongamento <i>1α</i> (EF1 α), com o aumento da razão TH / EF1 α no telencéfalo.	EUA	Darland <i>et al.</i> (2012)
Cloridrato de cocaína	0,2-50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 70 min	Embrião de <i>zebrafish</i>	Teste de locomoção	Inibição de movimentos (hipoatividade) à 5,5, 16,7 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	EUA	Irons <i>et al.</i> (2010)

Cocaína	1-33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 1 hora	<i>Zebrafish</i> selvagem (WT) e “ <i>dopamine transporter</i> (DAT) <i>knockout</i> ” (DATKO)	Teste de locomoção e comportamental.	Redução das distâncias percorridas por WT à alta velocidade (15 cm s^{-1}). Preferência pelo fundo do aquário (WT) a partir de 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$.	EUA	Kacprzak <i>et al.</i> (2017)
Cloridrato de cocaína	5 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 24-31 h (Teste de absorção/liberação). 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 70 min, 8 h e 48 h (Teste locomoção)	Embrião de <i>zebrafish</i> (5 hpf)	Toxicocinética e Teste de locomoção.	COC acumulou principalmente nos olhos, após 48 h. Acúmulo no cérebro foi semelhante ao observado no tronco, indicando difusão passiva. Hipoa-tividade locomotora.	Suíça	Kirla <i>et al.</i> (2016)
Cloridrato de cocaína	1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 48 hpf	Embrião de <i>zebrafish</i> (5 hpf)	Expressão da transcrição da substância P (SP mRNA) em relação à receptores de cocaína.	Aumento da expressão de SP mRNA à 24 hpf e diminuição à 48 hpf	Espanha	Lopez-Bellido, Barreto-Valer e Rodriguez (2013 ^a)
Cloridrato de cocaína	1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 48 hpf	Embrião de <i>zebrafish</i> (5 hpf)	Expressão de <i>tacr1</i> (<i>tacr1a</i> e <i>tacr1b</i>) após exposição à COC.	Aumento na expressão de <i>tacr1a</i> à 24 e 48 hpf. Aumento na expressão de <i>tacr1b</i> à 24 hpf e diminuição à 48 hpf.	Espanha	Lopez-Bellido, Barreto-Valer e Rodriguez (2013b)
Cloridrato de cocaína	1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 5 dias	<i>Zebrafish</i> adultos (machos e fêmeas)	Avaliação de ansiedade após abstinência e expressão de mRNA transportador de dopamina (zDAT)	Abstinência acarretou hiperatividade (mais rápida nas fêmeas e retardada nos machos), que pôde ser atenuada pela administração de COC. Redução de zDAT e aumento nos níveis de DA.	EUA	López-Patiño <i>et al.</i> (2008b)
Cloridrato de cocaína	0,015–15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 5 dias (Teste de locomoção); Abstinência de COC / 5 dias; 1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 72 h (Teste de redução de abstinência);	<i>Zebrafish</i> machos adultos (9 meses)	Teste de locomoção; Teste de redução de abstinência.	Não houve alterações locomotoras pela exposição à COC. Abstinência causou hiperatividade com estereotipia, amentando ao longo de 5 dias. Nova administração de COC reduziu hiperatividade e estereotipia.	EUA	López-Patiño <i>et al.</i> (2008a)

Cocaína	2,5-20 mg L ⁻¹ / 2 min (adultos) ou 15 seg (embriões)	<i>Zebrafish</i> adultos (6-8 meses) e embriões (5 dpf)	Eletrocardiograma (ECG)	Efeitos para EGC: resultados em formato sinoidal, com pico (maior taquicardia) à 5 mg L ⁻¹ para adultos e à 10 mg L ⁻¹ para embriões.	EUA	Mersereau <i>et al.</i> (2015)
Cocaína	2,5-20 mg L ⁻¹ / 48 hpf (desenvolvimento), 3 dpf (ECG) para embriões. 5 mg L ⁻¹ / 1,5 h (CPP) para adultos	<i>Zebrafish</i> embriões e adultos (8 meses).	Desenvolvimento, ECG (embriões). Teste CPP (adultos)	Diminuição das medidas telencefálicas e resultados de taquicardia em formato sinoidal mesmo após 24 h sem exposição (embrião). Exposição na fase larval resultou em sensibilidade à COC na fase adulta, com CPP dose-dependente (exceto para previamente expostos à 20 mg L ⁻¹).	EUA	Mersereau <i>et al.</i> (2016)
Cocaína	3 µmol L ⁻¹ / 5 dias (exposição); 5 dias (abstinência); 3 µmol L ⁻¹ / 15 min (exposição)	<i>Zebrafish</i> adultos (5-6 meses)	Teste de locomoção.	Aumento de atividade locomotora em 166 % após segunda exposição.	Argentina	Pisera-Fuster <i>et al.</i> (2019)
Cocaína	0,5 µmol L ⁻¹ / 48 e 72 hpf (15 min/dia) (exposição pré-natal); 0,5 µmol L ⁻¹ / 10 min (após 7 dpf) (exposição aguda).	Larva transgênica de <i>zebrafish</i>	Análise da resposta neuronal à cocaína	Exposição pré-natal (PCE) preveniu efeitos da exposição aguda de COC sobre a resposta à luz vermelha. Após exposição aguda, redução da resposta neuronal à luz vermelha, mas não ao escuro. Observadas alterações na distância percorrida e na latência para o primeiro movimento das larvas.	EUA	Riley, Koptiyenko e Zhdanova (2015)
Cocaína	0,5 µmol L ⁻¹ / 24, 48 e 72 hpf (15 min/dia) (exposição pré-natal); 0,5 µmol L ⁻¹ / 30 min (após 7 dpf) (exposição aguda); 0,5 µmol L ⁻¹ / 2 h (após 7 dpf) (Teste comportamental) ou 10 min (Teste de estímulos visuais).	Larvas de <i>zebrafish</i>	Análise da expressão do receptor de dopamina Drd1 e do transportador de dopamina (DAT); Teste comportamental. Teste de respostas neurais de cálcio a estímulos visuais.	Após PCE, redução da expressão de Drd1 no tectro óptico e em outras regiões do cérebro, mas não no telencéfalo. Após PCE e exposição aguda, redução da expressão de DAT mRNA. PCE sensibilizou larvas para um aumento de comportamento ansiogênico após exposição aguda. PCE e DATKO: tolerância à cocaína aguda nas principais regiões de atenção visual.	EUA	Ryley <i>et al.</i> , (2018)

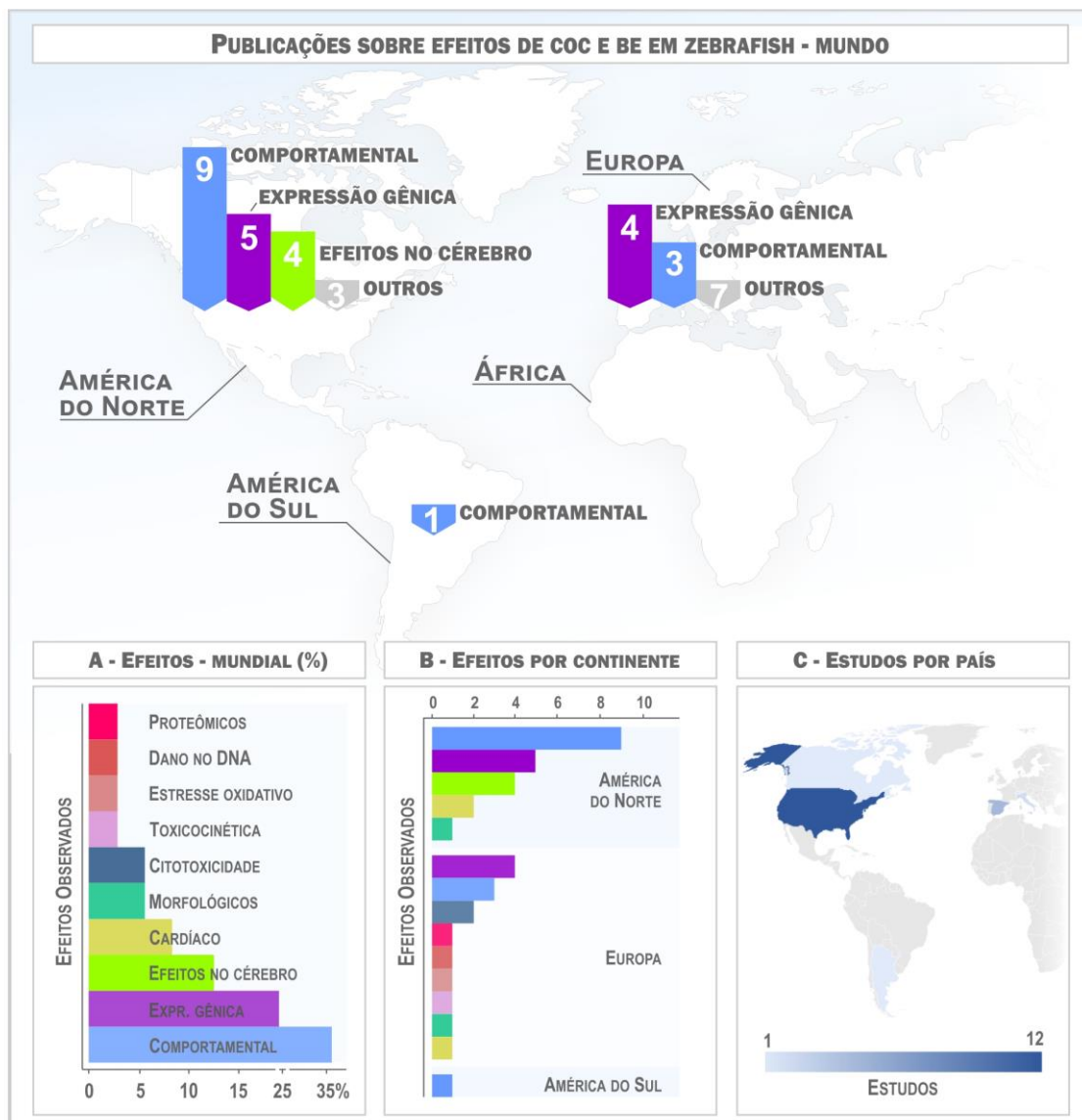
Cocaína	0,3-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / 15 min a cada 5 h	Embrião de <i>zebrafish</i> transgênico e selvagem	Análise do padrão neuronal de desenvolvimento: genes circadianos (zPer-3, zBmal-1) e genes que codificam receptores de melatonina (zMelR); Análise do desenvolvimento do cérebro.	Administração pré-natal de COC alterou a expressão de genes circadianos e genes que afetam a sinalização e neurotransmissão de melatonina (diurno). Administração repedida alterou desenvolvimento pré-natal.	EUA	Shang e Zhdanova (2007)
---------	--	---	---	---	-----	-------------------------

Quadro 6: Abordagem contaminante ambiental - Substância testada, concentração / tempo de exposição empregados, organismo modelo, testes realizados e efeitos observados em estudos de COC e/ou BE sobre *zebrafish*.

Composto	Concentração / tempo de exposição	Organismo modelo	Testes realizados	Principais efeitos observados	País	Referência
Benzoilecgonina (BE)	0,01-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ / 6 dias ou 51 HPF (Batimento cardíaco)	Embrião de <i>zebrafish</i>	Morfogênese, eclosão, taxa de batimento cardíaco, citotoxicidade e motilidade larval.	Não foram observados efeitos adversos.	Espanha	García-Cambero <i>et al.</i> (2015)
Efluente de estação de tratamento de esgoto (WWE) contendo COC e BE	2,31-2,81 ng L^{-1} (COC) e 13,5-14,5 ng L^{-1} (BE) / 30 seg	Embrião de <i>zebrafish</i>	Resposta fotomotora (zfPMR)	A inibição de zfPMRs, funcionando como biossensor de detecção de β -bloqueadores à ppb e ppt em WWE diluído.	Canadá	Gauthier e Vijayan (2019)
Cocaína, BE e éster metílico de ecgonina (EME)	0,04, 0,4, 4 e 40 nmol L^{-1} / 96 h	Embrião de <i>zebrafish</i>	Citotoxicidade, dano genético (SCGE), ensaio de difusão do DNA, teste de micronúcleo, SOD, CAT, GPx, GST e expressão gênica de SOD, CAT, GPx, GST	Redução da viabilidade celular, aumento da fragmentação do DNA, aumento de frequência apoptótica, formação de micronúcleos, genotoxicidade e desequilíbrio oxidativo (BE e EME mais tóxicos que COC).	Itália	Parolini <i>et al.</i> (2017)
Cocaína, BE e EME	0,3 e 1,0 mg L^{-1} / 96 h	Embrião de <i>zebrafish</i>	Análise proteômica	Modulação da expressão de proteínas em classes funcionais como citoesqueleto, constituintes do olho, transporte de lipídios, metabolismo de lipídios e energia, e resposta ao estresse.	Itália	Parolini <i>et al.</i> (2018)
36 contaminantes ambientais (a partir de monitoramento de esgoto) incluindo cocaína.	1100 ng L^{-1} (COC); 3701 ng L^{-1} (BE).	Larvas de <i>zebrafish</i>	Análise de expressão gênica em RNA	Expressão gênica: 100 reguladas positivamente e 77 reguladas negativamente	EUA	Subedi <i>et al.</i> (2021)

A partir dos dados demonstrados nos Quadros 5 e 6, foi possível identificar a proporção de efeitos e distribuição geográfica recorrentes dos estudos (Figura 9). Os efeitos/desfechos (*endpoints*) mais estudados foram os efeitos comportamentais e expressão gênica, representados respectivamente por 13 e 9 trabalhos, correspondendo a 35,1 e 24,3 % do total de efeitos investigados. Os 40,6 % restantes corresponderam principalmente aos 4 trabalhos sobre efeitos neurológicos (10,8 %), 3 sobre efeitos cardíacos (8,1 %), 2 sobre efeitos morfológicos (5,4 %) e 2 sobre citotoxicidade (5,4 %). Os demais efeitos, como padrões toxicocinéticos dos peixes expostos, danos no DNA, estresse oxidativo e proteômicos, não foram investigados em mais de um estudo, representando juntos 10,8 % do total de estudos.

Figura 9: Dados de distribuição de estudos no globo – Publicações sobre efeitos de COC e BE em *zebrafish*.



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de DE FARIAS ARAUJO et al., 2023).

O maior adensamento de estudos (Figura 9) está concentrado na América do Norte, com 56,5 % das publicações (13 estudos), enquanto a Europa representou 39,1 % das publicações (nove estudos). Apenas um estudo (comportamental) indexado foi observado na América Latina, revelando a carência da ampliação do conhecimento sobre efeitos da exposição de *zebrafish* à COC na região do globo de maior produção desse contaminante (UNODC, 2021b).

É importante notar que a maior parte dos trabalhos indexados investigou efeitos em embriões ou em larvas de *zebrafish* (16 trabalhos), enquanto nove estudaram efeitos em *zebrafish* adultos (Figura 10). Embriões e larvas foram analisados principalmente quanto à expressão gênica (25,9 % dos estudos com embriões), enquanto adultos foram principalmente investigados sobre efeitos comportamentais (66,7 % dos estudos com *zebrafish* adultos). Assim, os efeitos mais estudados em embriões foram expressão gênica (25,9 %), comportamental (18,5 %), efeitos neurológicos (14,8 %), cardíacos (11,1 %), morfológicos (7,4 %) e citotóxicos (7,4 %). Padrões toxicocinéticos, danos no DNA, estresse oxidativo e efeitos no perfil proteômico, corresponderam cada um a 3,7 % dos estudos com embriões ou larvas. Peixes adultos foram utilizados para investigação de apenas três *endpoints*, efeitos comportamentais (66,7 %), expressão gênica (16,7 %) e efeitos cardíacos (16,7 %).

Nos trabalhos selecionados pôde ser observada uma divisão entre dois grandes grupos de investigação de efeitos de COC e BE em ensaios com *zebrafish* (Figura 10). O primeiro, representado por 18 trabalhos, investigou efeitos de COC enquanto droga de abuso, reproduzindo concentrações encontradas em humanos (geralmente mg L^{-1}) e análises relacionadas à compreensão de mecanismos, toxicologia e farmacologia. O segundo grupo (cinco trabalhos), diferencia-se do primeiro grupo, investigando efeitos de COC e BE (e outros metabólitos) enquanto contaminantes ambientais, utilizando concentrações comparáveis às encontradas no meio ambiente (ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$). Os trabalhos do primeiro grupo investigaram *endpoints* utilizando *zebrafish* adultos, embriões e lavas, enquanto os trabalhos com abordagem ambiental priorizaram a exposição de embriões ou larvas. Com isso, os trabalhos selecionados nesta revisão seguem organizados conforme a abordagem: COC como droga de abuso e COC como contaminante ambiental.

Figura 10: Relação dos estudos indexados investigados, divididos por abordagem (saúde ou ambiental) e organismo modelo (*zebrafish* adulto ou embriões/larvas).



Fonte: Próprio autor, 2023 (adaptado de DE FARIAS ARAUJO et al., 2023).

3.2.4. Ecotoxicologia de COC enquanto droga de abuso

i. Efeitos comportamentais

A utilização do *zebrafish* como modelo de experimentação vem contribuindo para o preenchimento da lacuna entre modelos *in vitro* baseados em cultura de células e modelos *in vivo*, principalmente de roedores, permitindo um refinamento no uso de animais em pesquisas científicas em diferentes áreas de conhecimento (BROCK *et al.*, 2017). O *zebrafish* apresenta também vantagens enquanto modelo em estudos longitudinais de toxicologia, além de sensibilidade fisiológica e comportamental à COC (MERSEREAU *et al.*, 2016). Apesar de diferenças anatômicas durante o processo de desenvolvimento embrionário entre peixes teleósteos e mamíferos, como no desenvolvimento do prosencéfalo, são observados exemplos de conservação funcional, como na região das amígdalas, que relaciona-se com a regulação de medo, ansiedade e evitação, tanto no *zebrafish*, quanto em mamíferos (MERSEREAU *et al.*, 2016). O circuito de recompensa de teleósteos também assemelha-se ao de outros vertebrados, apontando o *zebrafish* como um modelo valioso para estudos dos efeitos de COC sobre o desenvolvimento embrionário, efeitos na fisiologia cardiovascular e efeitos comportamentais relacionados (MERSEREAU *et al.*, 2016).

A análise da função locomotora de larvas de *zebrafish* vem ganhando proeminência relacionada à avaliação de segurança de medicamentos (IRONS *et al.*, 2010). Larvas de *zebrafish* (6 dpf) foram expostas à três drogas (etanol, d-anfetamina e cocaína), conhecidas por produzirem uma dose-resposta em forma de "U invertido" em mamíferos (relacionável com as três substâncias, considerando administração aguda de etanol) (IRONS *et al.*, 2010). A exposição aguda à COC não produziu curva de dose-resposta em "U invertido" e doses mais

baixas não resultaram em hiperatividade nas larvas. Entretanto, doses mais altas (5,5, 16,7 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de COC) acarretaram hipoatividade (IRONS *et al.*, 2010). Assim, as larvas demonstraram à curto prazo, diminuição da atividade locomotora (hipoatividade) de modo dependente da concentração de COC, sendo mais pronunciada no escuro do que na presença de luz (5,5-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (IRONS *et al.*, 2010). Segundo os autores, a propriedade anestésica de COC pode ter afetado a atividade locomotora dos peixes, pois a COC é capaz de atravessar as barreiras das brânquias e da pele, possivelmente anestesiando nervos periféricos e atuando sobre o bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes nos músculos e brânquias (IRONS *et al.*, 2010).

De modo semelhante, Kirla *et al.* (2016) expuseram larvas de *zebrafish* (5 dpf) à 5, 10, 15, 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de COC por 20 min, 8 h e 48 h, observando maior atividade locomotora no escuro, comparada à avaliada em presença de luz. As larvas não demonstraram diferenças locomotoras em relação aos controles quando expostas à concentrações menores que 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, concordando com os resultados de Irons *et al.* (2010). Foi observada uma hipoatividade concentração-dependente após a exposição à curto prazo, e um comportamento semelhante após 8 h de exposição, porém com maiores diferenças dependentes da concentração. Após 48 h de eliminação, o comportamento das larvas expostas foi considerado indistinto dos controles. Uma vez que Kirla *et al.* (2016) também investigaram processos toxicocinéticos, os resultados de hipoatividade locomotora estariam associados à COC acumulada no tronco e/ou no cérebro dos peixes, enquanto o acúmulo nos olhos não teria afetado a locomoção. Foi observada apenas hipoatividade em todos os experimentos comportamentais de Kirla *et al.* (2016), mesmo considerando-se níveis cerebrais de COC normalmente associados à hiperatividade em mamíferos, demonstrando, portanto, sua atuação anestésica nas larvas de *zebrafish* enquanto mecanismo dominante e complementando os resultados observados por Irons *et al.* (2010).

Kacprzak *et al.* (2017) estudaram o sistema dopaminérgico e a exposição à COC (1-33 $\mu\text{mol L}^{-1}$) quanto aos efeitos ansiogênicos do envelhecimento, conforme diferentes fenótipos de *zebrafish*. Foram utilizados peixes nas idades de 3-4 meses (jovens), 4-18 meses (adultos), *zebrafish* machos (18 meses) DATKO (nocaute de transportador de dopamina) e controles WT (*wild type*). O nocaute de DAT (transportador de dopamina) resultou em um estado de ansiedade semelhante ao do *zebrafish* envelhecido, com peixes WT apresentando aumento (dependente da dose) na porção inferior do aquário à 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de COC, representado por cerca de 60 % do tempo despendido (KACPRZAK *et al.*, 2017). Os resultados de Kacprzak *et al.* (2017) demonstram que o envelhecimento no *zebrafish* está associado ao déficit de DAT e a um estado semelhante à ansiedade, e a respostas distintas à modulação dos receptores dopaminérgicos D1

vs. D2/D3. O fenótipo de envelhecimento semelhante à ansiedade no *zebrafish* se desenvolve ao longo da vida, podendo-se explorar a dinâmica dos mecanismos patogênicos e compensatórios envolvidos (KACPRZAK *et al.*, 2017).

Em estudo com *zebrafish* adultos machos (9 ± 1 meses de idade), López-Patiño *et al.* (2008a) avaliaram níveis de dopamina cerebral após exposição por 5 dias (≈ 1 hora/dia) à $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloridrato de COC, realizando um teste de redução de abstinência nos peixes. Doses não anestésicas de COC ($0,015\text{--}15 \mu\text{mol L}^{-1}$) não resultaram em alterações agudas na atividade locomotora dos peixes, não sendo observados efeitos de ansiedade, aumento de atividade ou estereotipia após administração, apesar dos altos níveis de COC no cérebro ($7\text{--}120 \text{ pg } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) (LÓPEZ-PATIÑO *et al.*, 2008b). Entretanto, a hiperatividade comportamental associada a estereotipia (principalmente observada no fundo e paredes do aquário) aumentou progressivamente durante o período inicial de abstinência (24–72 h), assemelhando-se ao tratamento com a droga ansiogênica GG-7142. Os efeitos da abstinência aumentaram ao longo de cinco dias, seguindo-se a redução da hiperatividade e estereotipia após nova administração de COC ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou uma dose não sedativa de Diazepam ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$, imersão) (LÓPEZ-PATIÑO *et al.*, 2008b). Segundo os autores, a absorção de COC pelo peixe pode acarretar efeitos periféricos relacionados às propriedades anestésicas da droga. Os resultados sugerem que a abstinência da COC produz efeitos comportamentais de longa duração no *zebrafish*, sendo consistentes com um estado semelhante a ansiedade (LÓPEZ-PATIÑO *et al.*, 2008b) e consistentes com o estado de hiperatividade em peixes adultos, observado no estudo de Kacprzak *et al.* (2017). López-Patiño *et al.* (2008b) também utilizaram o ensaio de avaliação da atividade locomotora, porém para análise entre diferenças de efeitos associados ao gênero de *zebrafish*. A exposição inicial à COC ($1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, imersão) não alterou agudamente o comportamento dos peixes, enquanto sua abstinência acarretou um estado de ansiedade desenvolvido primeiramente nas fêmeas, porém, mais robusto e persistente nos machos (LÓPEZ-PATIÑO *et al.* 2008b). Esse estado de ansiedade nos machos, entretanto, pôde ser atenuado pela nova administração de COC, podendo representar um efeito relacionado à redução geral no transportador de dopamina (zDAT), bem como ao aumento nos níveis de dopamina após a retirada da COC (LÓPEZ-PATIÑO *et al.* 2008b). Até o momento, os estudos com larvas de *zebrafish* costumam apresentar resultados de hipoatividade locomotora, como observados por Irons *et al.* (2010), Kirla *et al.*, (2016) e López-Patiño *et al.* (2008a), diferenciando-se dos modelos mamíferos, enquanto os estudos com peixes adultos apresentam resultados de hiperatividade, possivelmente associada à idade dos peixes (KACPRZAK *et al.*, 2017) e influenciada pelo fator gênero. (LÓPEZ-PATIÑO *et al.* 2008b).

Psicoestimulantes são capazes de provocar efeitos sobre a função visual após exposição aguda e pré-natal, sejam estes adversos ou terapêuticos (sobre o déficit de atenção) (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015). Visando avaliar o impacto da exposição pré-natal aguda à COC no processamento visual, Riley *et al.* (2015) estudaram as respostas neuronais a estímulos visuais em duas regiões do cérebro (tectum óptico e telencéfalo dorsal) de larva transgênica de *zebrafish* (6-7 dpf) capaz de expressar o indicador de cálcio GCaMP-HS. As respostas locomotoras a estímulos visuais foram avaliadas após exposição das larvas à 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de COC, observando-se que o tectum óptico responde tanto ao flash claro quanto ao flash escuro, enquanto o telencefalo dorsal responde apenas ao flash claro. A exposição aguda de COC inibiu as respostas ao flash de luz, tanto no tectum óptico quanto no telencefalo dorsal, porém neste, interferindo na adaptação a apresentação de estímulos repetidos (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015). Esses resultados demonstram-se valiosos quanto ao entendimento de papel principal do tectum óptico na mediação de mudanças pré-natais na atenção, induzidas pela exposição à COC (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015).

Além da avaliação da atividade locomotora, o ensaio de preferência condicionada de lugar (CPP) é um paradigma experimental clássico no qual o organismo modelo é exposto a um estímulo primário no contexto de certas pistas ambientais (DARLAND *et al.*, 2012; TZSCHENTKE, 1998). O grau de reforço comportamental é medido pela frequência com que o animal se aproxima das pistas ambientais na ausência do estímulo primário nas tentativas subsequentes. O ensaio CPP provou ser receptivo ao estudo de recompensa na maioria dos organismos modelo vertebrados, incluindo o *zebrafish* (DARLAND *et al.*, 2012; DARLAND; DOWLING, 2001). A visão tradicional de recompensa é que quando um comportamento, como se alimentar ou ter atividade sexual, aumenta os níveis dopamina no nucleus accumbens. Esse aumento da dopamina é traduzido em atividade motivada do animal de forma que o comportamento se repete (DARLAND; DOWLING, 2001). A COC, por exemplo, aumenta os níveis de dopamina ao bloquear a atividade do transportador de dopamina. Uma maneira pela qual essa sensibilidade a drogas de abuso foi modelada em mamíferos inferiores é o paradigma da CPP (DARLAND; DOWLING, 2001).

Darland e Dowling (2001) estudaram 18 famílias F2 de *zebrafish* (8-12 meses de idade), geradas a partir de fundadores mutagenizados com N-metil-nitrosourea. Não foram observadas diferenças relacionadas ao gênero dos peixes. Três famílias da geração F3 (*dum*, *jpy* e *gts*) apresentaram respostas anormalmente baixas à COC no teste CPP, sugerindo a ação de uma única mutação dominante. Dessa forma, testes de adaptação visual ao escuro foram realizados visando verificar se as baixas respostas ao teste CPP seriam resultado de alteração

do sinal dopaminérgico no cérebro. Os testes de adaptação visual ao escuro demonstraram que peixes WT tornaram-se menos sensíveis à luz após a exposição, enquanto peixes das famílias *dum* e *jpy* foram insensíveis à exposição à COC para o teste visual. Entretanto, as famílias *gts* apresentaram resultados de adaptação visual semelhantes aos dos peixes WT. Também foi verificada se a baixa resposta ao teste CPP seria devido à uma alteração na capacidade de memória e aprendizado dos peixes. O teste de aprendizagem revelou que a família *dum* apresentou resultados piores em relação ao controle, indicando pequeno ganho de tempo para encontrar o reservatório final no tanque T-maze após tentativa inicial. Já *jpy* e *gts* apresentaram resultados semelhantes aos peixes WT. Os diferentes resultados de adaptação visual ao escuro e de aprendizagem para as três famílias que apresentaram baixa sensibilidade ao teste CPP, sugeriram a ocorrência de mutações em genes distintos, afetando a sinalização dopaminérgica na retina e no cérebro. Essas mutações genéticas não foram caracterizadas por Darland e Dowling (2001), entretanto, os autores enfatizam que a triagem genética direta do *zebrafish* traduz-se em um modo eficaz de investigação de genes relacionados à adicção.

Darland *et al.* (2012), avaliaram o papel do sistema dopaminérgico na mediação da CPP induzida por COC em *zebrafish* adultos (6-8 meses), por meio do co-tratamento de peixes com COC e antagonistas dopaminérgicos. Após avaliação da preferência de *baseline*, os peixes receberam os diferentes tratamentos no *rear compartment*, compreendidos em água (controle), 10 mg L⁻¹ de lidocaína, 10 mg L⁻¹ de COC, COC com o antagonista DR2 sulpirida (10 µmol L⁻¹) e COC com o antagonista DR1 SCH23390 (10 µmol L⁻¹). A exposição à lidocaína foi considerada como controle por compartilhar propriedades anestésicas de COC, porém sem efeitos recompensadores de bloqueio de transportadores monoaminérgicos. Os controles não demonstraram alterações no teste CP, assim como os peixes tratados com lidocaína. Como esperado, 10 mg L⁻¹ de COC induziram respostas de CPP significativas nos peixes. O tratamento com sulpirida bloqueou a alteração de CPP provocada por 10 mg L⁻¹ de COC, enquanto a presença de SCH23390 não causou efeitos sobre as alterações de CPP decorrentes da COC. Sabendo-se que os efeitos do sistema de recompensa de dopamina são presumidamente mediados pelos receptores de dopamina (DR), o estudo de Darland *et al.* (2012) evidencia a importância do papel de DR2 (mas não de DR1) nessa mediação, em *zebrafish* tratados com COC.

Mersereau *et al.* (2016) avaliaram se a exposição à COC (0, 2,5, 5, 10, 20 mg L⁻¹) durante o desenvolvimento embrionário de *zebrafish* acarretaria efeitos sobre o comportamento (ensaio CPP) de peixes longitudinais adultos. Peixes adultos provenientes dos cinco tipos de tratamento embrionário foram submetidos à 5 mg L⁻¹ de COC durante o ensaio comportamental.

Os controles do ensaio comportamental (UNT CPP) corresponderam à peixes não expostos à COC durante o ensaio CPP, provenientes de todos os cinco tratamentos embrionários. A exposição à 5 mg L⁻¹ de COC durante o ensaio comportamental induziu CPPs significativas para todos os cinco tratamentos embrionários em relação aos peixes UNT CPP, exceto para o tratamento embrionário com 20 mg L⁻¹ de COC. Foi observado um gráfico dose-resposta em forma de sino, com maiores efeitos para 10 mg L⁻¹ de COC, o qual foi significativamente maior que os efeitos nos peixes não tratados com COC durante a fase embrionária (0 mg L⁻¹ de COC). Os resultados sugerem que a exposição precoce em embriões sensibiliza as vias que regulam o sistema de recompensa relacionado à COC, demonstrando o aumento da sensibilidade dos peixes à droga até a concentração de 10 mg L⁻¹. Segundo os autores, a baixa resposta dos peixes pré tratados com 20 mg L⁻¹ de COC poderia ser explicada pelo fato já terem sido hipersensibilizados (MERSEREAU *et al.* 2016).

Pisera-Fuster *et al.* (2019) analisaram se a exposição prévia à COC, seria capaz de tornar *zebrafish* adultos mais vulneráveis a alterações locomotoras e à CPP induzida por nicotina. Na fase de iniciação, um grupo de peixes foi sensibilizado pela exposição repetida de 3 µmol L⁻¹ de COC por 5 dias, enquanto um segundo grupo foi sensibilizado com 5 µmol L⁻¹ de nicotina (NIC) por 5 dias, seguindo-se 5 dias de abstinência. Para os controles, os peixes foram administrados apenas com solução salina (SAL) por 5 dias, seguida de abstinência por 5 dias. Após isso, na fase de expressão, os peixes foram novamente desafiados com as mesmas concentrações, correspondendo aos tratamentos de iniciação-expressão: SAL-SAL, SAL-NIC, NIC-NIC, SAL-COC, NIC-COC e COC-COC. Os peixes sensibilizados com COC ou NIC nadaram maiores distâncias que os peixes tratados com solução salina durante a iniciação. Após fase de expressão, peixes submetidos à COC-COC foram capazes de nadar distâncias significativamente maiores que todos os demais tratamentos, exceto NIC-NIC. Além disso, peixes SAL-COC demonstraram maiores períodos de imobilidade que os peixes SAL-SAL. Maiores períodos de imobilidades também foram observados em peixes NIC-COC quando comparados com SAL-COC e COC-COC. Já o tempo despendido na porção inferior do aquário na fase de iniciação, foi significativamente maior em peixes tratados com COC, seguindo-se os tratados com SAL e com NIC, respectivamente. Semelhantemente, peixes desafiados novamente com NIC demonstraram a maior permanência na porção superior do aquário. Segundo os autores, esses efeitos sugerem um comportamento de maior ansiedade nos peixes tratados com COC e um desfecho ansiolítico associado à NIC. A sensibilização da atividade locomotora induzida por cocaína (166 %) foi mais proeminente que a observada para tratamentos com nicotina (103 %), com ambas as drogas causando incrementos de atividade até

o quarto dia de experimento, com efeitos ansiogênicos da exposição à COC foram observados após o quinto dia. No teste CPP, grupos de peixes foram previamente sensibilizados por cinco dias com $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de COC, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NIC e controle (SAL), seguindo-se cinco dias de abstinência e nova administração com NIC ou SAL, correspondendo aos tratamentos SAL-SAL, SAL-NIC, NIC-SAL, NIC-NIC, COC-SAL e COC-NIC. Foi observada CPP nos grupos NIC-NIC e COC-NIC, com *scores* significativamente maiores em COC-NIC comparada com NIC-NIC. Segundo os autores, esses achados sugerem que as atividades cerebrais envolvidas na sensibilização comportamental aplicada aumentam as propriedades recompensadoras de nicotina, principalmente associadas à pré-exposição à COC. Assim, a sensibilização em decorrência do uso casual repetitivo de drogas de abuso como COC pode reforçar propriedades de drogas como a NIC (PISERA-FUSTER et al., 2019).

Visando analisar de forma mais robusta o valor preditivo do modelo *zebrafish* no ensaio CPP para efeitos subjetivos humanos (sinais positivos robustos), Brock *et al.* (2017) expandiram o número de compostos testados em *zebrafish*, utilizando um desenho de estudo padronizado. Os peixes foram expostos à $5,9$ a $29,4 \text{ mg L}^{-1}$ de COC, com resultados comparados com os gerados para a autoadministração de ratos e CPP, bem como para a autoadministração de primatas não humanos (NHP). Os resultados revelaram que os valores de concordância e sensibilidade do *zebrafish* não foram significativamente diferentes do acaso para efeitos subjetivos humanos. Embora possa haver valor preditivo com compostos de classes farmacológicas específicas (por exemplo, agonistas do receptor μ -opióide, psicoestimulantes) para o *zebrafish* no ensaio CPP, os dados destacam que o modelo *zebrafish* no CPP não agrega valor à avaliação pré-clínica de potencial de abuso, conforme a metodologia utilizada (BROCK *et al.*, 2017). Essa afirmação discorda dos demais estudos abordados para CPP neste trabalho, possivelmente, devido à sua abordagem metodológica diferenciada, carecendo de mais estudos que corroborem com os achados de Brock *et al.* (2017).

ii. Alterações na expressão gênica

O estudo genético de embriões de *zebrafish* permite identificar novos genes que alteram a fisiologia e o comportamento ante à drogas causadores de dependência (DARLAND *et al.*, 2012). Análises sobre a expressão de genes responsáveis pela formação dos transportadores de dopamina (zDAT) e pelos receptores dopaminérgicos (Drd), podem auxiliar no entendimento da complexa rede de efeitos causados por drogas de abuso (RILEY *et al.*, 2018). Para compreender os efeitos da COC no sistema dopaminérgico, Riley *et al.* (2018), estudou a expressão de genes *dat* mRNA e do receptor 1 de dopamina (Drd1) (proteína

receptora), durante o desenvolvimento pré-natal de embriões de *zebrafish*. A exposição aguda de COC ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 30 min) suprimiu a expressão do gene *dat* em 2,04 vezes e do gene *Drd1* nas regiões do tectum óptico e cerebelo dos embriões (RILEY *et al.*, 2018). A redução na expressão do gene *dat* em embriões expostos a $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de COC por 15 min também foi observada por Shang e Zhdanova (2007). Por outro lado, Barreto-Valer *et al.* (2012), observou o aumento na expressão dos receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a* e *drd3* em torno de 48 hpf após exposição de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de COC, com posterior redução em 72 hpf. A exposição pré-natal a COC pode resultar em fenômenos de tolerância na expressão de genes responsáveis pela recaptação da dopamina (zDAT) e produção de receptores (*drd*), proporcionando efeitos comportamentais, como ansiedade (MEYER; SHERLOCK; MACDONALD, 1992; RILEY *et al.*, 2018).

A ansiedade está relacionada como um dos principais sintomas da retirada da COC (BLANCHARD; BLANCHARD, 1999), assim, estudar as bases genéticas em resposta a abstinência de COC em modelos de *zebrafish*, podem fornecer uma contribuição valiosa para compreender os mecanismos envolvidos na ansiedade associada a síndrome de abstinência (MARKOU; KOOB, 1991). Desta forma, López-Patiño *et al.* (2008a), estudou as diferenças de gênero na expressão dos genes zDAT e os níveis de dopamina (DA) no cérebro de *zebrafish* adultos durante exposição aguda e em um modelo de abstinência, no qual foi retirada a COC após sucessivas exposições. As avaliações na expressão dos genes ocorreram após 30 min da exposição aguda de COC ($0,15 \mu\text{M}$) e após 72 h da retirada da droga no modelo de abstinência (três doses sucessivas). Durante a exposição aguda, a COC não induziu alterações significativas na expressão do gene zDAT ou nos níveis de dopamina. Por outro lado, no modelo de abstinência a COC, houve uma redução significativa na expressão de zDAT e aumento nos níveis de DA (LÓPEZ-PATIÑO *et al.*, 2008b). A diminuição de zDAT mRNA pode diminuir os níveis das proteínas DAT, que contribuem com o aumento de DA. Além disso, a diminuição de zDAT promove a diminuição de DA no citosol com subsequente redução de feedback na síntese de DA e atividade da tirosina hidroxilase (WALLACE, 2007).

A tirosina hidroxilase (TH) é uma importante enzima responsável pela síntese de dopamina, a expressão de seus dois genes (TH1 e TH2) em *zebrafish* pode ser alterada em exposições agudas a COC (DARLAND *et al.*, 2012). Os níveis de transcrição de TH2 mRNA foram reduzidos significativamente no telencéfalo de peixes adultos quando expostos a COC (10 mg L^{-1}) por 1 hora, enquanto os níveis de TH1 não alteraram (DARLAND *et al.*, 2012). As alterações causadas pela COC na expressão de genes relacionados ao processo de dependência, como receptores dopamina (*drd*), transportadores de dopamina (*dat*) e síntese de tirosina

hidroxilase (*th*), são ativados pelo fator de transcrição *Pitx3*, *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *otpa*, *otpb* e *nurr1* e pela proteína Ndr2, sendo importantes na diferenciação, função e manutenção de neurônios dopaminérgicos (BARRETO-VALER *et al.*, 2012; BARRETO-VALER; LÓPEZ-BELLIDO; RODRÍGUEZ, 2013). Além disso, o fator *Pitx3* é regulado pelo microRNAs (miRs) 133b por meio de feedback negativo (KIM *et al.*, 2007). Desta forma, foi observada redução no número de moléculas de miR-133b de embriões (24 e 48 hpf) expostos a COC, e aumento na expressão de *Pitx3* em 24 hpf com posterior diminuição em 48 hpf (BARRETO-VALER *et al.*, 2012). Um aumento na expressão dos fatores de transcrição *nurr1*, *lmx1b.1* e *lmx1b.2* foi observado em embriões de *zebrafish* expostos a COC (1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 24 hpf e com diminuição em 48 hpf, acompanhado da diminuição na expressão do fator *opt* e dos genes *th* e *dat* (BARRETO-VALER; LÓPEZ-BELLIDO; RODRÍGUEZ, 2013). Mudanças na expressão desses fatores podem alterar o desenvolvimento do sistema nervoso central, uma vez que a DA está envolvida no início do desenvolvimento do cérebro (LIU; LESTER, 2011). Alterações na expressão dos genes relacionados aos receptores (*drd*), transportadores (*dat*) de DA e atividade da enzima tirosina hidroxilase (*th*) em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário do *zebrafish* podem ser causados pelos efeitos da COC na expressão de diversos fatores de transcrição, como *Pitx3*, *lmx1b*, *Otpa*, *Nurr1*, responsáveis pela formação e diferenciação dos precursores neuronais dopaminérgicos (BARRETO-VALER *et al.*, 2012; BARRETO-VALER; LÓPEZ-BELLIDO; RODRÍGUEZ, 2013; FILIPPI *et al.*, 2007).

Os genes da taquicinina 1 (TAC1) possuem sequências de nucleotídeos precursores da substância P (SP), um peptídeo relacionado com o aumento da ansiedade, quando seus níveis estão diminuídos (PENNEFATHER *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009), estando relacionados com processos de adicção (KOMBIAN *et al.*, 2003). Genes *tacr1a* (48.96 kDa) e *tacr1b* (40.53 kDa) foram determinados durante a embriogênese de *zebrafish* nos cromossomas 5 e 11, respectivamente, apresentando 66% de homologia com os genes dos seres humanos (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013b). Além disso, embriões de *zebrafish* apresentam genes que codificam o precursor SP (TAC1) homólogos em seres humanos (PENNEFATHER *et al.*, 2004), sendo observado um aumento progressivo na expressão de SP mRNA durante a embriogênese (8 a 72 hpf), com pico de expressão em 72 hpf e mínimo em 8 hpf (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013a). A exposição de embriões de *zebrafish* à COC (1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) resultou em um aumento da expressão de *tacr1a* e *tacr1b* em 24 hpf, com posterior redução na expressão de *tacr1a* em 48 hpf (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013b). A expressão de SP mRNA durante a embriogênese também foi alterada em embriões expostos a COC (1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 5 hpf). Os

embriões de *zebrafish* expostos aumentaram a expressão de SP mRNA no início da embriogênese (24 hpf) em regiões do sistema nervoso central e na medula espinhal, com posterior redução no final da embriogênese (48 hpf) (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013a). Este comportamento da expressão dos genes SP pode estar relacionado a processos de indução da proliferação celular (OPOLKA *et al.*, 2012) e mecanismos apoptóticos induzidos pela COC (LEE *et al.*, 2008). SP é considerado um neurotransmissor primário de neurônios sensoriais que mediam a transmissão sináptica de dor (SEYBOLD, 2009) e ansiedade (PENNEFATHER *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009). Assim, as mudanças decorrentes da ação da COC na expressão de mRNA de *tacr1a* e *tacr1b* podem ter influenciado esses mecanismos sinápticos (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013b, 2013a). O estudo do sistema de taquicinina usando o *zebrafish* pode melhorar a compreensão de diferentes situações clínicas onde o sistema de taquicinina está envolvido, auxiliando a entender melhor a interação do sistema da taquicinina com outros sistemas, frente ao uso de COC (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013b).

A exposição pré-natal de COC pode desregular ritmos fisiológicos por alterações na expressão de genes relacionados ao sistema circadiano. Alterações nesse sistema durante o desenvolvimento inicial do embrião, podem afetar o controle da divisão celular (DEKENS *et al.*, 2003) com múltiplas anormalidades embrionárias. Os embriões de *zebrafish* possuem os mecanismos circadianos ativos desde o início da embriogênese (DELAUNAY *et al.*, 2000) e o hormônio melatonina e seus receptores formados ao final de 1 dpf, apresentado 6 receptores homólogos encontrados em mamíferos (REPPERT *et al.*, 1995). Neste sentido, Shang and Zhdanova, (2007) avaliaram a expressão de genes circadianos (*zBmal-1*, *zPer-3*) e receptores de melatonina (*zMelR*) em embriões de *zebrafish* (WT sepa AB) e $\alpha 1$ -TGFP (*zebrafish* transgênico). A exposição à COC (0.3 μ M) causou inibição na expressão dos genes *zBmal-1* e *zPer-3* e aumento de 4 vezes na expressão dos genes *zMelR*. As alterações no sistema circadiano causadas pela COC demonstram efeitos em um sistema não-alvo da droga, além do impacto da exposição em embriões dependendo da hora do dia, com diferenças diurnas e noturnas no comportamento dos efeitos da COC (SHANG; ZHDANOVA, 2007). Toda dinâmica apresentada pelo *zebrafish* a nível molecular na expressão de genes e fatores de transcrição em resposta à administração e retirada de COC, sugerem um caminho promissor para abordar a ligação entre mecanismos genéticos, comportamentais e neuroquímicos da abstinência da COC, auxiliando nas ferramentas terapêuticas no tratamento da dependência LÓPEZ-PATIÑO *et al.*, 2008a).

iii. Efeitos neurológicos

A importância do estudo de efeitos neurológicos com *zebrafish* relaciona-se com o entendimento de mecanismos ainda pouco estudados, como déficits de atenção, no objetivo de contribuir com informações que visam mitigar esses efeitos, sejam decorrentes da exposição do indivíduo adulto ou pré-natal (RILEY et al., 2018). A exposição pré-natal à COC (PCE - *prenatal cocaine exposure*) é relatada como capaz de interferir na morfologia cerebral e causar déficits em funções visuais em *zebrafish* (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015; SHANG; ZHDANOVA, 2007). O uso do *zebrafish* em estudos neurológicos de dependência à drogas de abuso tem se mostrado uma ferramenta valiosa, uma vez que é um modelo responsivo às propriedades recompensadoras de drogas como a COC (DARLAND; DOWLING, 2001; GERLAI et al., 2000; LEVIN; CHEN, 2004; NINKOVIC et al., 2006).

A percepção visual é crucial para processamento de estímulos, os quais desempenham forte relação com a regulação da dependência de drogas de abuso (OVERTON; DEVONSHIRE, 2008; WEISS, 2010). O vício e recaídas no uso de COC estariam relacionadas ao aumento do risco do abuso em humanos de maneira pré-natal (DELANEY-BLACK et al., 2011; RICHARDSON et al., 2013). Riley, Kopotiyenko e Zhdanova (2015) estudaram a resposta neuronal e habituação à estímulo visual em larvas transgênicas de *zebrafish* submetidas à exposição pré-natal de COC (PCE) $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A PCE não acarretou alterações significativas na resposta ao estímulo, porém preveniu efeitos da exposição aguda de COC à luz vermelha (PCE+COC), sugerindo que a PCE conferiu uma tolerância ao psico-estimulante. Já a exposição aguda à COC afetou o processamento visual de modo diferenciado, reduzindo a resposta à luz vermelha, porém não à ao escuro. O telencéfalo dorsal (homólogo ao córtex cerebral de mamíferos) respondeu somente ao estímulo da luz, enquanto o tectum óptico apresentou respostas semelhantes tanto à luz vermelha, quanto ao escuro (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015).

Déficits de atenção visual e cognitiva decorrentes de PCE podem interferir no desenvolvimento cerebral, prejudicando aprendizado, memória e adaptações sociais desde as primeiras idades de um indivíduo (ACCORNERO et al., 2007; HEFFELFINGER; CRAFT; SHYKEN, 1997; HEFFELFINGER et al., 2002; RICHARDSON, 1998; STRUTHERS; HANSEN, 1992). Neste sentido, Riley. *et al.* (2018) estudaram os efeitos da PCE ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a atenção visual em larvas de *zebrafish*. Larvas desprovidas de transportador de dopamina (DATKO) e larvas-PCE apresentaram tolerância à exposição à COC quanto às principais regiões de atenção visual (telencéfalo e tectum óptico). Riley. *et al.* (2018) sugeriram que, uma vez que na ausência de dopamina os efeitos de COC sobre o processamento visual

persistiram, outros alvos além de dopamina poderiam estar envolvidos nos efeitos observados. Assim, a utilização do modelo DATKO favoreceu a hipótese de que alterações decorrentes da PCE sobre a expressão de DAT no tectum óptico e no telencéfalo podem mediar efeitos de atenuação visual provocada por COC (RILEY *et al.*, 2018). Os resultados demonstraram o papel do tectum óptico na sustentação e na mediação das mudanças na atenção visual acarretadas pela exposição pré-natal. Uma vez que humanos expostos à COC de modo pré-natal podem apresentar déficit de atenção visual e disfunção colicular, o estudo da PCE em *zebrafish* poderia beneficiar no entendimento dos mecanismos relacionados à efeitos de psico-estimulantes (RILEY; KOPOTIYENKO; ZHDANOVA, 2015).

Shang e Zhdanova (2007), também exploraram a investigação de efeitos da exposição pré-natal de COC sobre o desenvolvimento neurológico. Embriões de *zebrafish* foram expostos à 0,3-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de COC (15 minutos / 5 h), resultando em alterações no padrão neuronal de desenvolvimento (SHANG; ZHDANOVA, 2007). A transparência dos embriões permitiu o monitoramento de seu desenvolvimento neurológico frente à exposição à COC, apoiando-se também na observação de indicadores (*reports*) genéticos fluorescentes como a proteína verde fluorescente (GFP), pelo uso de *zebrafish* transgênico $\alpha 1$ -T-GFP (GOLDMAN *et al.*, 2001). Após a exposição, foi observada a redução da GFP (mais frequente) ou aumento da fluorescência associada a neurônios (SHANG; ZHDANOVA, 2007). Esses efeitos teriam relação com alterações induzidas por COC sobre a expressão de genes que afetam o crescimento e a neurotransmissão. Apesar disso, Shang e Zhdanova (2007) explicam que a relação entre neurodesenvolvimento e efeitos circadianos da COC ainda precisam ser melhor elucidados.

iv. Efeitos cardíacos

Efeitos cardiovasculares decorrentes do consumo de COC têm sido observados em mais da metade dos sintomas relatados por usuários em entradas em centros de pronto-socorro (MARAJ; FIGUEREDO; LYNN MORRIS, 2010). Os estudos dos efeitos cardiovasculares de COC complementam as investigações sobre vício, sugerindo possíveis tratamentos cardiovasculares, apesar de ainda ser uma relação que requer maiores investigações (MERSEREAU *et al.*, 2015). O uso do *zebrafish* como modelo para investigação de efeitos de drogas de regulação cardiovascular como COC, estaria sustentado por semelhanças com características encontradas em mamíferos, como desenvolvimento, estrutura, função e regulação do sistema cardíaco (MERSEREAU *et al.*, 2015).

Em 2015, Mersereau *et al.* avaliaram eletrocardiogramas (ECGs) de *zebrafish* adultos expostos à COC (2,5, 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1}) por 2 minutos, resultando em uma curva dose-

resposta em formato de sino, com um pico de batimentos por minuto observado à 5 mg L^{-1} (uma frequência máxima cardíaca), seguido de casos de bradicardia para as maiores doses. Em seguida, embriões de *zebrafish* foram expostos à COC (2,5, 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1}), resultado em aumento significativo da frequência cardíaca à 5 e à 10 mg L^{-1} de COC, seguido de diminuição de batimentos por minuto até a bradicardia observada à 20 mg L^{-1} . Com isso, os autores concluíram que a resposta dos embriões foi comparável à dos peixes adultos, sugerindo que embriões de *zebrafish* podem ser um modelo aplicável para avaliação da exposição de COC sobre o sistema cardiovascular em desenvolvimento (Mersereau *et al.* 2015). Visando testar se efeitos de antagonistas adrenérgicos sobre a taquicardia decorrente da COC seriam comparáveis entre peixes adultos e o esperado em mamíferos, COC (5 mg L^{-1}) foi coadministrada com Atropina ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) (antagonista do receptor muscarínico de acetilcolina), Fentolamina ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) (antagonista α -adrenérgico) e Propranolol ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) (antagonista de β -receptores). Tanto as coadministrações com Atropina, quando com Fentolamina, não foram capazes de bloquear a taquicardia causada pela COC, diferenciando-se da coadministração com Propranolol ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), eficaz em conter aumentos significativos dos batimentos cardíacos nos peixes (Mersereau *et al.* 2015). Os resultados com Propranolol sugerem que a taquicardia induzida por COC é mediada pelo aumento da atividade do sistema simpático, enquanto a ausência de efeito da administração de Atropina sugere um baixo impacto parassimpático decorrente da exposição (Mersereau *et al.* 2015).

Semelhantemente, Mersereau *et al.* (2016) expuseram larvas de *zebrafish* à COC (2,5, 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1}), avaliando batimentos cardíacos após três dias de exposição e um dia de recuperação sem contato com a droga. Novamente, foi observado um efeito de dose-resposta em formato de sino, porém desta vez todos os tratamentos resultaram em aumentos significativos em relação ao controle (MERSEREAU *et al.*, 2016). Os aumentos foram observados de modo crescente até a concentração de mg L^{-1} de COC. O menor aumento dos batimentos nos peixes foi observado à 20 mg L^{-1} de COC. Os autores enfatizaram que esses aumentos foram observados mesmo 24 h após a exposição, a ocorrência de alterações no sistema simpático dos peixes em decorrência da exposição (MERSEREAU *et al.*, 2016). Em relação aos resultados longitudinais, a exposição embrionária à COC não redundou em efeitos longitudinais significativos sobre a taxa de batimento cardíaco em *zebrafish* adultos (MERSEREAU *et al.*, 2016). Essa ausência de efeito sobre a frequência cardíaca basal dos peixes adultos longitudinais sugeriu a ocorrência de uma forma de compensação (MERSEREAU *et al.*, 2016), apontando a necessidade de maiores investigações sobre esta hipótese. Em seguida, os peixes longitudinais foram tratados com $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de Isoproterenol

(agonista β -adrenérgico), sabendo-se de seu potencial de aumento da frequência cardíaca nos peixes, enquanto um segundo grupo recebeu nova administração de COC (MERSEREAU et al., 2016; MERSEREAU 2015). Os peixes co-tratados com fármaco apresentaram diminuições na frequência cardíaca para os grupos longitudinais expostos previamente à 5 e 10 mg L⁻¹ de COC, enquanto os grupos controle, 2,5 e 20 mg L⁻¹ de COC não apresentaram sensibilização significativa ao fármaco. Já para os peixes tratados novamente com COC, foi observada novamente a sinalização de um efeito com resposta sinoidal, com um aumento significativo na frequência cardíaca observado no grupo previamente exposto à 10 mg L⁻¹ de COC. Segundo os autores, a baixa resposta ao Isoproterenol sugere que a mediação dos efeitos de COC relacionada à sinalização β -adrenérgica foi atenuada em decorrência da exposição precoce, concordando com dados da literatura observados para roedores (MERSEREAU et al., 2016). Além disso, o efeito de resposta sinoidal observado na reexposição à COC, assemelha-se aos resultados observados para os demais parâmetros cardíacos analisados em embriões e adultos, sugerindo que a via simpática dos peixes foi sensibilizada a partir da pré-exposição (MERSEREAU et al., 2016).

v. Efeitos morfológicos

Efeitos morfológicos como baixo peso ao nascer e recém-nascidos com cérebros menores têm sido reportados como decorrentes da exposição *in útero* à COC (FRANK et al., 2001; GREWEN et al., 2014; VOLPE, 1992). Além disso, adolescentes que sofreram exposição *in útero* podem apresentar anormalidades cardiovasculares e cognitivas (FENG, 2005; MEYER; ZHANG, 2009; MINNES et al., 2014; RICHARDSON et al., 2015). O uso do *zebrafish* como modelo para estudo de efeitos morfológicos, apresenta-se como uma alternativa para superar fatores de confundimento em estudos com humanos, como a exposição simultânea a outras drogas e diferenças de padrão nutricional (MERSEREAU et al., 2016). O uso de *zebrafish* apresenta vantagens em relação à modelos mamíferos, como a possibilidade de análise não invasiva de embriões translúcidos (MERSEREAU et al., 2016). Algumas alterações morfológicas como tamanho do corpo, diâmetro do olho, área telencefálica, diencéfalo e cérebro posterior, têm sido utilizadas como *endpoints* em estudos dos efeitos toxicológicos de compostos químicos sobre a morfologia de *zebrafish* em ensaios com embriões, larvas e organismos adultos. Nos estudos de Mersereau et al. (2016), a exposição às concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 mg L⁻¹ de COC resultou em efeitos leves da COC sobre a morfologia embrionária (5 dpf), não diferenciando-se significativamente dos controles quanto ao tamanho corporal, tamanho dos olhos, área de diencéfalo e cérebro traseiro. Contudo, foram observadas

diminuições dose-dependentes significativas quanto à área telencefálica em doses mais altas (10 e 20 mg L⁻¹). Segundo os autores, o impacto na diminuição do tamanho do telencefálico pode estar relacionado ao tempo de incubação, sugerindo que a cocaína penetra prontamente no córion em determinadas fases. Em acréscimo, esse efeito sobre o telencéfalo de embriões de *zebrafish* poderia estar relacionado à uma expansão mais lenta das conexões intracelulares e formação de neurópilos na região do pálio (MERSEREAU et al., 2016). Os efeitos da exposição pré-natal de *zebrafish* à COC sobre o desenvolvimento cerebral relatados por Shang e Zhdanova (2007), foram relatados na sessão 2.1.3 (Efeitos neurológicos) deste documento. Assim, trabalho de Mersereau *et al.* (2016) destacou-se como o único reportado nesta sessão por avaliar como efeitos principais as alterações morfológicas decorrentes da exposição à COC.

vi. Implicações toxicocinéticas

O uso do *zebrafish* como alternativa aos modelos mamíferos vem demonstrando prominência, porém é necessário observar as diferenças relacionadas com as vias de exposição, uma vez que a COC é geralmente inalada, insuflada ou injetada em mamíferos (BOOZE et al., 1997), enquanto peixes têm comumente o corpo inteiro exposto (BOEHMLER et al., 2007; IRONS et al., 2010). Essas diferenças podem influenciar de modo diferenciado nos processos toxicocinéticos nos dois modelos, sendo necessárias investigações dos padrões de distribuição e de concentração (KIRLA *et al.*, 2016). Kirla *et al.* (2016) estudaram a toxicocinética da COC e de seus metabólitos em larvas de *zebrafish* com 5 dpf. As larvas foram expostas por 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 8, 10, 24, 27 e 31 h à 5 µmol L⁻¹ (1,5 mg L⁻¹) e à 50 µmol L⁻¹ (15 mg L⁻¹) de cloridrato de cocaína. A COC foi rapidamente absorvida pelas larvas, com em aumentos de concentração no corpo (inteiro) dos peixes até 8 h de exposição, resultando nos picos de 81 mg kg⁻¹ para a exposição de 1,5 mg L⁻¹ e 445 mg kg⁻¹ para a exposição de 15 mg L⁻¹, com uma constante de absorção (κ_{in}) de 12,91·kg⁻¹·h⁻¹. Entretanto, a via de exposição de COC nos peixes poderia ser considerada como um viés em relação à toxicocinética de modelos mamíferos, apresentando, por exemplo, diferenças quanto ao tempo de aporte na corrente sanguínea e absorção máxima muito menor que 8 h (KIRLA *et al.*, 2016). Para verificação da eliminação, as larvas expostas foram transferidas para um ambiente livre de COC, sendo coletadas para análise após 1, 3, 8, 24, 27, 31 e 48 h. Aproximadamente 63 % da COC foi eliminada em 24 h, porém com concentrações restantes permanecendo nas larvas mesmo após 48 h, apontando para um metabolismo de eliminação lento ou depósito em algum tecido (KIRLA *et al.*, 2016). A hipótese de acúmulo de COC em um órgão seria embasada por resultados de eliminação apresentarem-se menores que os valores preditos pela equação de toxicocinética monocompartimental

aplicada (KIRLA *et al.*, 2016). A COC foi quantificada no tecido de cérebro, olhos e tronco dissecados, após as 8 h de exposição à $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, resultando em maior acúmulo nos olhos ($1516 \pm 84 \text{ mg kg}^{-1}$), seguido do cérebro ($406 \pm 44 \text{ mg kg}^{-1}$) e o tronco ($255 \pm 32 \text{ mg kg}^{-1}$). A COC também foi mensurada nos tecidos dissecados após 24h de exposição, seguida de 48h de eliminação. Nesse cenário, a concentração de COC nos olhos dos peixes ainda era semelhante à observada após 8 h ($1331 \pm 98 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto cérebro e tronco apresentaram diminuições drásticas para $50 \pm 3,7 \text{ mg kg}^{-1}$ e $44 \pm 2,2 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, indicando que a COC não só acumula altas concentrações nos olhos do peixe, como se mantém por longos períodos neste tecido (KIRLA *et al.*, 2016). A concentração de norcocaína (metabólito formado no fígado) analisada resultou em níveis semelhantes aos da COC, indicando a via distribuição interna como a principal de aporte de COC na região dos olhos do peixe (e não a difusão externa) (KIRLA *et al.*, 2016). A basicidade e a lipofilicidade da COC e da norcocaína teriam contribuído para sua concentração nos olhos dos peixes, podendo acarretar em aprisionamento por afinidade com melanóforos (KIRLA *et al.*, 2016). Essa característica seria explicada pelo mecanismo de dissociação lenta dos complexos melanina-droga (MASON; INGRAM; ALLEN, 1960), e também pela retardo na metabolização e excreção no sistema óptico (AL-GHANANEEM; CROOKS, 2007).

3.2.5. Ecotoxicologia de COC enquanto contaminante ambiental

i. Efeitos comportamentais, cardíacos e morfológicos

Cocaína e seu metabólito ativo BE vêm sendo detectados no meio ambiente, devido ao aporte associado à esgotos domésticos, tornando-se um fato ainda mais agravado ao considerar-se a baixa eficiência de estações de tratamento na sua remoção (GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015; FONTES *et al.*, 2019; SPOSITO *et al.*, 2018). Com isso, a maior parte da COC e seus metabólitos alcançaria águas superficiais, poluindo potencialmente corpos hídricos e deflagrando um cenário de agravo do qual emerge a importância de investigações sobre os efeitos de suas concentrações ambientais (GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015). Além disso, o aporte de COC e BE em rios desassociados de ETEs estaria relacionado principalmente à presença de esgotos clandestinos *in natura*, agravando ainda mais o cenário de degradação ambiental.

O *zebrafish* tem se mostrado um modelo valioso para o entendimento do potencial tóxico de contaminantes aquáticos, como drogas de abuso, seja em testes de toxicidade aguda com embriões, ou na análise de *endpoints* subletais relacionados ao desenvolvimento (ex.: cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade etc) (GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015).

Neste sentido, García-Camero *et al.* (2015) investigaram efeitos comportamentais (locomoção de larvas), efeitos cardíacos (presença de edema, circulação prejudicada e frequência de batimentos cardíacos) e sobre o desenvolvimento (morfologia, biometria e incubação), utilizando *zebrafish* expostos à BE (0,01-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). As concentrações ambientais de BE foram avaliadas durante o desenvolvimento vascular embrio-larval dos peixes, visando contribuir para um melhor entendimento do potencial risco desta substância para o meio ambiente. A exposição à BE não alterou a eclosão, motilidade larval e a taxa de batimento cardíaco dos peixes (51 hpf) expostos. Esses resultados estariam de acordo com a fraca atividade farmacológica da BE reportada pela literatura em outros vertebrados como ratos (expostos à 32-64 mg kg pc^{-1}) (MORISHIMA *et al.*, 1999, 2001). Como o córion dos peixes poderia representar uma barreira à BE, foi realizado um novo experimento com embriões de 48 hpf expostos por 4 dias à BE (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), resultando em ausência de efeitos sobre a viabilidade e comportamento (GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015). Os autores também avaliaram efeitos sobre o desenvolvimento dos peixes, concluindo que as concentrações ambientais de BE não pareceram alterar a morfogênese do modelo *zebrafish* embrio-larval. Entretanto, mais investigações seriam necessárias para a definição do potencial tóxico do metabólito BE em concentrações ambientais nos referidos *endpoints*, agregando ao conhecimento levantado por García-Camero *et al.* (2015).

ii. Dano no DNA, citotoxicidade e estresse oxidativo

Sabendo-se que COC e seus metabólitos, principalmente BE e EME (ecgonina metil éster), têm sido observados de modo recorrente em estudos detecção ambiental, suas concentrações podem acarretar efeitos subletais à organismos não-alvo (PAROLINI *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, BE tem sido detectada em concentrações maiores que seu composto parental, dada a estabilidade de COC nesses ambientes e seu metabolismo no corpo humano (PAROLINI *et al.*, 2017). O potencial tóxico de BE e EME têm sido investigado em organismos aquáticos como moluscos, em *endpoints* como genotoxicidade e dano oxidativo (PAROLINI *et al.*, 2013; PAROLINI; BINELLI, 2013). A exposição de organismos não-alvo à contaminantes ambientais ativos, pode induzir ao estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas a partir da exposição, podendo acarretar peroxidação lipídica e danos no DNA (YAN *et al.*, 2015). Observada a relevância dos testes com embriões de *zebrafish* na investigação de efeitos subletais, podem ser destacados como organismo modelo relevante para estudos de efeitos cito-genotóxicos de COC e seus metabólitos em concentrações ambientais (PAROLINI *et al.*, 2017).

Parolini *et al.* (2017) avaliaram os efeitos de concentrações ambientais de COC e seus metabólitos em embriões de *zebrafish* para os *endpoints* dano no DNA, estresse oxidativo e citotoxicidade. Os embriões foram expostos por 96 h às concentrações 0,04, 0,4, 4 e 40 nmol L⁻¹ de COC e seus principais metabólitos, BE e EME. Danos genéticos primários (quebras de fita de DNA) e fixos (frequência celular apoptótica, necrótica e micronucleada) foram investigados pela eletroforese em gel de célula única (SCGE), e o ensaio de difusão de DNA e o teste do micronúcleo (teste MN). A exposição a COC e seus principais metabólitos, BE e EME, induziu efeitos cito-genotóxicos em células embrionárias de *zebrafish*, observados pela diminuição significativa da viabilidade celular. O efeito citotóxico foi observado apenas em exposições com concentrações de BE e EME superiores a 0,4 nmol L⁻¹, e em concentrações superiores a 4 nmol L⁻¹ de COC, sugerindo que os metabólitos são mais tóxicos que a COC em embriões de *zebrafish*. Os resultados mostraram que a exposição de COC, BE e EME causou um aumento significativo na fragmentação de DNA em células embrionárias, confirmando a capacidade dos compostos em induzir lesões genéticas primárias. Segundo Parolini *et al.*, (2017), os resultados demonstram essa relação, uma vez que o aumento significativo na frequência de células apoptóticas foi induzido pela exposição a todos os compostos testados, sendo maior o desencadeamento do processo apoptótico com EME, em relação a COC e BE.

Por outro lado, García-Camero *et al.* (2015) também avaliaram a viabilidade celular de embriões de *zebrafish*, observando que a exposição à 0,01-1000 µg L⁻¹ de BE não provocou alterações sobre a viabilidade celular, sugerindo a hipótese da baixa toxicidade de BE e/ou a ação protetiva do córion. As divergências entre os estudos de García-Camero *et al.* (2015) e Parolini *et al.* (2017) indicam a necessidade de mais estudos para a melhor compreensão da ação de BE sobre a viabilidade celular. Parolini *et al.* (2017) investigaram o *endpoint* necrose nos peixes, observando que a maior concentração testada (40 nmol L⁻¹) causou um aumento significativo (de necrose), com COC e EME induzindo níveis de morte celular maiores do que BE na mesma concentração, enquanto ambos os metabólitos afetaram a viabilidade celular também em concentrações mais baixas (0,4 e 4 nmol L⁻¹). Diferentemente, apenas a exposição às maiores concentrações de BE (4 nmol L⁻¹ e 40 nmol L⁻¹) promoveu a formação de micronúcleos em embriões de peixe-zebra, enquanto nenhum efeito significativo foi observado após os tratamentos com COC e EME para cada concentração testada (PAROLINI *et al.*, 2017).

Em relação ao estresse oxidativo, a exposição às substâncias testadas resultou em indução da atividade da enzima superóxido dismutase (4 e 40 nmol L⁻¹ – COC e BE), catalase (0,4 nmol L⁻¹ – BE), glutationala peroxidase (0,04, 0,4, 4 e 40 nmol L⁻¹ - COC e BE) e glutationala-S-transferase (GST) (0,4 e 40 nmol L⁻¹ – BE), além do aumento significativo de espécies

reativas de oxigênio (ROS) nos embriões expostos à COC (0,4, 4 nmol L⁻¹) e BE (0,4, 4 e 40 nmol L⁻¹) (PAROLINI *et al.*, 2017). Segundo os autores, o aumento de ROS teria relação com a toxicidade de COC, o que teria levado aos aumentos das defesas antioxidantes observados nos embriões (PAROLINI *et al.*, 2017). Já a parcial ativação de GST sugere um processo de detoxificação de BE via metabolismo de fase II (PAROLINI *et al.*, 2017), pela conjugação com glutathiona, tornando mais hidrossolúvel para sua eliminação (YAN *et al.*, 2015). Segundo Parolini *et al.* (2017), devido à alta variabilidade dos biomarcadores, não foi possível avaliar com exatidão a toxicidade de COC e BE. No entanto, o índice de resposta de biomarcador sugeriu que COC teria apresentado um menor efeito tóxico em relação a BE, no entanto, maiores investigações são necessárias para confirmação da hipótese (PAROLINI *et al.*, 2017). Somando-se a esse argumento, acrescenta-se o contraste entre os estudos de Parolini *et al.* (2017) e García-Camero *et al.* (2015), indicando a necessidade de maiores investigações.

iii. Alterações no perfil proteômico

Análises proteômicas permitem uma profunda investigação dos potenciais mecanismos de ação das substâncias, sendo considerada uma valiosa ferramenta para elucidar mudanças globais em sistemas biológicos complexos envolvendo uma grande rede de proteínas com diversas funções nos organismos (MONSINJON; KNIGGE, 2007). Identificar a expressão de proteínas que são afetadas pela exposição a COC e seus metabólitos em vertebrados representa um importante passo para elucidar os possíveis mecanismos de ação. Além disso, abordagens proteômicas permitem individualizar os potenciais alvos de ação dessas drogas de abuso, direcionando novos estudos para investigar os danos e consequências das exposições (PAROLINI *et al.*, 2018a). Neste sentido, Parolini *et al.* (2018) investigaram os efeitos de COC e de dois de seus metabólitos (BE e EME) nas concentrações 0,3 e 1,0 µg L⁻¹ sobre embriões de *zebrafish* por meio de uma abordagem proteômica funcional. A COC foi capaz de modular significativamente os níveis de 15 (↑8 e ↓7) e 17 (↑13 e ↓4) proteínas para as concentrações de 0,3 e 1 µg L⁻¹, respectivamente. BE e EME alteraram significativamente 17 (↑15 e ↓2) e 16 (↑12 e ↓4) proteínas (à 0,3 µg L⁻¹), e 27 (↑17 e ↓10) e 25 (↑21 e ↓4) proteínas na concentração de 1 µg L⁻¹, respectivamente. Dentre as 113 proteínas isoladas, 53 apresentaram alterações na quantidade de proteínas envolvidas no transporte de lipídios, estrutura do olho, metabolismo lipídico e energético, estrutura citoesquelética e resposta ao estresse oxidativo. Assim, os metabólitos (principalmente BE) demonstraram ser mais tóxicos do que a COC, tornando preocupante o fato de BE ser o principal metabólito de COC detectado no ambiente. As

principais alterações foram relatadas nas funções de estrutura de olho (crystallins – Crys) e mecanismos que modulam o estresse oxidativo (peroxiredoxin-2 - Prdx2), como metabolismo lipídico (Apolipoprotein A1 - ApoA1, Fatty Acid Binding Protein 3 - Fabp3) e energético (creatine kinases - Cks) (PAROLINI et al., 2018a).

iv. Alterações na expressão gênica

Uma vez em águas residuais, COC e seus metabólitos entram em contato com outras substâncias ativas, incluindo fármacos, podendo resultar em interações complexas e deflagrar uma variedade de efeitos tóxicos à organismos não-alvo (PAROLINI *et al.*, 2017), incluindo efeitos genotóxicos. Com isso, a alta homologia genética do *zebrafish* com mamíferos beneficia seu uso como importante modelo (SUBEDI *et al.*, 2021) em estudos de investigação de danos ao DNA. A exposição à COC durante o estágio embrional do *zebrafish* pode induzir a alterações de expressões de genes relacionados à receptores de dopamina, assemelhando-se à alterações observadas em modelos mamíferos (BARRETO-VALER *et al.*, 2012). Esses fatos apontam a importância do *zebrafish* como modelo para estudos de alterações de expressão gênica decorrente da exposição a concentrações ambientais de COC, inclusive quanto em misturas complexas. A avaliação de efluentes de duas ETEs e de dois corpos de águas superficiais revelou a presença de fármacos e de drogas de abuso, incluindo COC e BE nos EUA (SUBEDI *et al.*, 2021). A partir dessa investigação, Subedi *et al.* (2021) definiram três grupos de exposição para os ensaios com larvas de *zebrafish*: fármacos, drogas de abuso, e um grupo com todas as 36 substâncias investigadas, sendo este último, experimentado com concentrações médias observadas nas águas superficiais e um *worst case* (pior caso) de detecção ambiental. Dentre as drogas de abuso utilizadas, podem ser citadas COC, BE, norcoína, cocaetilen, anfetamina, metanfetamina e metilfenidato (respectivamente, 1100, 3701, 50, 43,3, 2300, 2750 e 10,7 ng L⁻¹). Os autores investigaram expressões diversos genes e enfatizaram a exposição ao *worst case* pelos maiores efeitos observados, resultando na expressão de 100 genes regulados positivamente e 77 negativamente. Dentre as expressões de genes codificadores de proteínas, destacaram-se as relacionadas ao sistema nervoso. Além dessas, foram identificadas principalmente sequências associadas ao sistema imunológico dos peixes. Segundo Subedi *et al.* (2021), o uso de larvas justifica-se por aproximar-se mais de uma exposição ambiental em comparação com o uso de embriões decorionados. Embora os efeitos relatados representem uma mistura complexa de substâncias, destacamos que o trabalho de Subedi *et al.* (2021) foi o único que avaliou efeitos de expressão gênica em exposição de *zebrafish* à concentrações ambientais de COC e BE.

v. Efeitos neurológicos

Misturas complexas de COC e seus metabólitos podem ocorrer no ambiente, incluindo misturas com substâncias β -bloqueadoras (BBs). Essas substâncias têm sido detectadas em águas superficiais (GODOY; KUMMROW; PAMPLIN, 2015) e reportadas como capazes de afetar organismos aquáticos (HEDGESPETH; NILSSON; BERGLUND, 2016). Mesmo em concentrações traço, BBs podem provocar efeitos psicotrópicos em peixes (HEDGESPETH; NILSSON; BERGLUND, 2016), apontando que ensaios não invasivos de seus efeitos podem ser estudados em organismos como o *zebrafish*, sendo um modelo consolidado em estudos de neurotoxicidade (GAUTHIER; VIJAYAN, 2019). Dessa forma, o teste fotomotor de embrião de *zebrafish* (zfPMR), compreendido como uma contração aguda do embrião induzida por fotoestimulação de fotorreceptores à base de opsina, seria uma ferramenta para a detecção de BBs (GAUTHIER; VIJAYAN, 2019), mesmo em presença de outros contaminantes psicotrópicos como a COC. A abordagem zfPMR apresenta-se como uma importante ferramenta para a medição do estímulo de inervações neuronais no cérebro posterior, funcionando como um *screening* da atividade de adrenoreceptores (GAUTHIER; VIJAYAN, 2019). Gauthier e Vijayan (2019) publicaram o único trabalho de exposição de embriões de *zebrafish* à concentrações ambientais de COC e BE para a investigação de efeitos neurológicos. Os embriões foram expostos à efluente de ETE contendo COC (2,31-2,81 ng L⁻¹) e BE (13,5-14,5 ng L⁻¹) juntamente com fármacos como amitriptilina, metabólitos de fármaco como 10-hydroxi-amitriptilina, e o inseticida DEET (N,N-Dietil-m-toluamida). Os embriões foram co-tratados com um agonista β -adrenérgico (isoproterenol) com o objetivo de analisá-los enquanto modelo para respostas fotomotoras (zfPMRs) à β -bloqueadores. Foi observada a inibição de zfPMRs, funcionando como biossensor de detecção de β -bloqueadores às concentrações de em níveis de ng L⁻¹ e μ L⁻¹ em WWE diluído. Os autores ressaltaram que o método de detecção de β -bloqueadores foi possível mesmo com a presença de outras substâncias neuroativas, como COC e BE. Apesar de não terem sido avaliados propriamente os efeitos de COC e BE no cérebro dos peixes - e sim se influenciariam na análise de um efeito cerebral para detecção de β -bloqueadores, entendemos que o trabalho de Gauthier e Vijayan (2019) deve considerado, como o único a tratar de efeitos neurológicos de níveis ambientais de COC e BE sobre *zebrafish* expostos.

3.3. PROSPECÇÕES FINAIS DO REFERENCIAL TEÓRICO

A partir do arcabouço de informações apresentadas sobre os dados de consumo, detecção ambiental e quadro de precariedade de rios urbanos do Rio de Janeiro relacionado aos

níveis de esgotos associados, emerge a importância da investigação sobre presença de COC e BE nesses corpos hídricos. Uma vez detectados COC e BE nesses rios, faz-se necessária a investigação ecotoxicológica associada aos níveis ambientais associados, sobretudo considerando-se os efeitos descritos pela literatura abordados neste referencial, bem como a escassez de trabalhos utilizando essas concentrações e organismos modelo como o *zebrafish*.

A partir dos dados sobre a toxicidade de COC e BE em *zebrafish* descritos, conforme as abordagens ecotoxicologia de COC enquanto droga de abuso e enquanto contaminante ambiental, foi elaborado o artigo de revisão da literatura “*Zebrafish (Danio rerio)* as a model to assess the effects of cocaine as a drug of abuse and its environmental implications”. O artigo referido foi publicado em janeiro de 2023 pela revista *Environmental Science and Pollution Research* (<https://doi.org/10.1007/s11356-023-25402-0>), Qualis A2 (classificação 2017-2000), Fator de impacto 5,190 (2021).

Assim, as informações levantadas neste referencial teórico indicam um sinal de alerta sobre a possibilidade de contaminação de rios urbanos no Rio de Janeiro por COC e BE, bem como a necessidade de testes ecotoxicológicos que investiguem essas concentrações quanto à capacidade de causar efeitos adversos.

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES E PROCEDIMENTOS LABORATORIAS

O kit para análise do biomarcador superóxido dismutase (SOD) foi fornecido pela empresa Cayman Chemical Company (Michigan, EUA).

Substâncias utilizadas no estudo:

- Cocaína [$C_{17}H_{21}NO_4$] (1 mg mL⁻¹ em metanol, CAS N° 50-36-2, LGC Standards®);
- Benzoilecgonina [$C_{16}H_{19}NO_4$] (1 mg mL⁻¹ em metanol, CAS N° 519-09-5, LGC Standards®);
- Cocaína-D3 [$C_{17}H_{18}NO_4D_3$] (1 mg mL⁻¹ em acetonitrila, CAS N° 65266-73-1, Cerilliant® / Sigma-Aldrich);
- CDNB (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno), disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de Acros Organics (EUA) em frasco contendo 100 g à 98% de pureza;
- Ácido clorídrico (HCl) 37 %: disponível em líquido, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 1 L;
- Bicarbonato de sódio PA ($NaHCO_3$): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de ISOFAR Ind de Produtos Químicos (Brasil) em frasco contendo 500 g;
- Cloreto de potássio (KCl): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g, possuindo 74,55 de peso molecular;
- Cloreto de sódio (NaCl): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g, possuindo 84,01 de peso molecular;
- Dihidrogenio fosfato de potássio (KH_2PO_4): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g à 99% de pureza, possuindo 136,09 de peso molecular;
- DTNB – Reagente de Ellman (ácido dinitro benzóico): disponível em pó, obtido a partir da Sigma-Aldrich (Brasil), em frasco contendo 1 g;
- EDTA.Na₂ - Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico: disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em

frasco contendo 100 g, possuindo 292,24 de peso molecular;

- Etanol PA (C_2H_6O): disponível em líquido, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de Dinâmica em frasco contendo 1 L;
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g;
- Glutathiona redutase ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$ - GSH): disponível em pó (cristalizado), mantido sob refrigeração, obtido a partir de Sigma-Aldrich (Brasil) em frasco contendo 25 g a 99% de pureza;
- Hidrogênio fosfato de potássio (K_2HPO_4): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g a 98% de pureza, possuindo 174,18 de peso molecular.
- Hidróxido de Sódio (NaOH): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido a partir de VETEC Química Fina (Brasil) em frasco contendo 500 g, possuindo 40,0 de peso molecular;
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): disponível em líquido, mantido sob refrigeração, obtido a partir de Merck KGaA (Alemanha) em frasco contendo 1 L a 30% de pureza;
- Sacarose: disponível em pó, mantida sob refrigeração, obtida a partir da Sigma-Aldrich (Brasil), em frasco contendo 5 kg;

4.2. PRIMEIRA ETAPA: MONITORAMENTO AMBIENTAL DE COC E BE

A primeira etapa correspondeu à fase de monitoramento de COC e BE em águas fluviais da Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara (Figura 11).

4.2.1. Amostragem e análises físico-químicas

Os pontos de coleta foram amostrados em águas fluviais na Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara, correspondendo a:

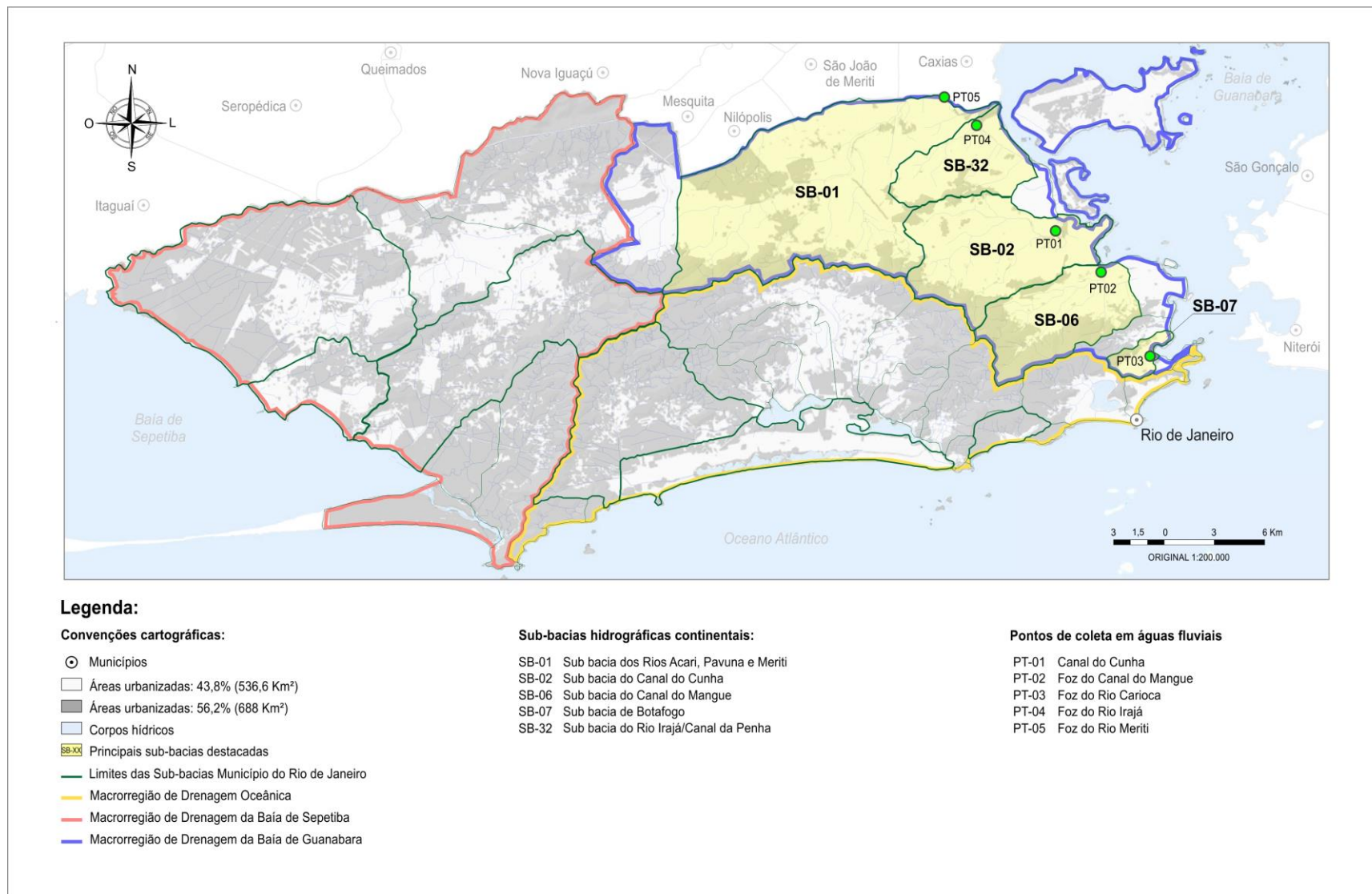
- Canal do Cunha – PT01 (UTM 22°52'49.36"S; 43°14'23.08"O, Zona 23K) Apresentando IQA qualificado como muito ruim (Figura 8), o Canal do Cunha está localizado na sub-bacia de mesmo nome, a qual abrange bairros como Mangueinhos, Cachambi, Benfica, Meier, Engenho da Rainha, Piedade e Benfica, sendo representada principalmente pelos rios Jacaré, dos Frangos, Faria (IQA muito ruim) e Timbó (estes últimos, originando o Canal Faria-Timbó) (INEA, 2019a). O ponto de coleta foi definido sobre ponte na Av. Brasil, altura de Mangueinhos por motivos técnicos de viabilidade de coleta.
- Foz do Canal do Mangue – PT02 (UTM 22°54'1.29"S; 43°12'36.68"O, Zona 23K) Localizado na Sub-bacia de mesmo nome, o Canal do Mangue (IQA muito ruim) é uma importante via de drenagem do MRJ, a qual abrange a região da grande Tijuca e Centro da cidade do Rio de Janeiro (Figura 8) (INEA, 2019a). Com uma extensão de 3 km, as águas do canal são o resultado da mistura das águas de rios como Rio Maracanã, Rio Joana, Rio Trapicheiro e Rio Comprido, todos qualificados como precários quanto à índices de qualidade de água (Figura 8) (INEA, 2019a; SOS MA, 2019, 2020);
- Foz do Rio Carioca – PT03 (UTM 22°56'0.63"S; 43°10'20.40"O, Zona 23K) Apresentando um IQA regular (SOS MA, 2019, 2020), o Rio Carioca está localizado em sua maior extensão na sub-bacia de mesmo nome, restando apenas alguns metros até seu deságuas na Sub-Bacia de Botafogo (sem nenhum afluente a partir da divisa entre as sub-bacias. O ponto de coleta foi escolhido como à montante da estação de tratamento do Aterro do Flamengo da CEDAE, visando corresponder à uma amostra mais comparável com a dos demais pontos de coleta. O Rio Carioca tem sua nascente na Floresta da Tijuca, passando pelos bairros Cosme Velho e Laranjeiras, além de receber aporte águas de diferentes canais do bairro Catete.
- Foz do Rio Irajá – PT04 (UTM 22°49'6.05"S; 43°17'6.09"O, Zona 23K) Localizado na Sub-bacia do Rio Irajá/Canal da Penha, o rio Irajá apresenta IQA classificado como muito ruim (Figura 8), recebendo aporte de águas escoadas dos bairros Irajá, Brás de Pina, Penha, Cordovil, Olaria e arredores, por meio dos rios Arapogi, Quitungo (IQA regular)

e Bicas, além de canais como o Castelo Branco e Canal da Penha (IQA muito ruim) (Figura 8) (INEA, 2019a; SOS MA, 2019, 2020).

- Foz do Rio Meriti - PT05 (UTM 22°48'3.08"S; 43°18'19.65"O, Zona 23K) Localizado na Sub-bacia dos Rios Pavuna, Acari e Meriti, o Rio Meriti (IQA muito ruim) faz divisa entre os Municípios do Rio de Janeiro e Duque de Caxias e desagua na Baía de Guanabara (Figura 8). Apresentando uma extensão de 5,6 km, o Rio Meriti abrange os bairros de Parque Anchieta, Pavuna, Jardim América e Vigário Geral, destacando-se por apresentar índice de qualidade de água precário em 100 % de seus afluentes monitorados (Rios Pavuna, Acari e Cachorros) (Figura 8) (INEA, 2019a; SOS MA, 2019, 2020).

Todos os rios e canais urbanos monitorados estão associados ao aporte de águas fluviais que perpassam aglomerados urbanos subnormais. Segundo o IBGE, esgotamento sanitário é considerado o serviço de maior precariedade nesses locais (IBGE, 2010). Uma vez considerada a relação entre o aporte de COC e BE em ambientes naturais e esgotos (MALDANER et al., 2012), a presença de localidades com potencial aporte de esgotos *in natura* nos corpos hídricos investigados deve ser levada em consideração como fator de influência parcial para a presença destes contaminantes.

Figura 11: Mapa dos pontos de coleta em águas fluviais na Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara.



Fonte: Próprio autor, 2023

Em cada um dos cinco pontos investigados foram coletados 1 L de amostra (amostra simples) para as análises cromatográficas e físico-químicas. O detalhamento dos dias, horários de coleta foram dispostos no Anexo II deste documento. Os frascos de coleta foram previamente lavados em água corrente, mantidos em banho de ácido nítrico 5 % por 48 h, rinsados com hexano 98-99%, enxaguados em água ultrapura, rinsados em metanol PA e enxaguados novamente em água T1 (água ultrapura) (adaptado de CETESB, 2011). A coleta foi realizada sobre ponte em cada ponto investigado, observando a profundidade de cerca de 50 cm da superfície. A profundidade de coleta foi determinada em 50 cm, uma vez que COC e BE tendem a permanecer na coluna d'água (FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013). As amostras foram acidificadas em campo à pH 2 com HCl (EMCDDA, 2016; POSTIGO; LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2008), transportadas e armazenadas à 4 °C por 24 h (CASTIGLIONI *et al.*, 2013).

Foram realizadas oito campanhas de monitoramento, considerando o período de 8:30-12:30h, englobando tanto a estação seca (menor pluviosidade) nos dias 12/05/22 (quinta-feira), 11/07/22 (segunda-feira), 22/08/22 (segunda-feira) e 19/09/22 (segunda-feira), quanto a chuvosa (maior pluviosidade) nos dias 24/10/22 (segunda-feira), 16/11/22 (quarta-feira), 19/12/22 (segunda-feira) e 17/01/23 (terça-feira) (ANEXO II). Com isso, foram avaliados os níveis de COC e BE em contraste com índices pluviométricos das últimas 96 h até amostragem obtidos a partir de dados do portal ALERTA RIO (2023). Os dados pluviométricos foram obtidos conforme índices da Estação AlertaRio atrelada à sub-bacia hidrográfica correspondente a cada ponto de coleta, sendo Estação 23 (Grande Méier) para C. do Cunha, Estação 33 (Tijuca/Muda) para C. do Mangue, Estação 31 (Laranjeiras) para Rio Carioca, Estação 11 (Irajá) para Rio Irajá e Estação 24 (Anchieta) para o Rio Meriti.

Nitrogênio amoniacal e demanda química de oxigênio foram analisados de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (CLESCERI; GREENBAERG; EATON, 1998) no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologias e Inovação no Tratamento de Água e Efluentes (LABIFI-UERJ) e pH, condutividade, salinidade e temperatura foram analisados utilizando uma sonda multiparâmetros Hanna HI 9828 (Woonsocket, EUA).

4.2.2. Parâmetros de extração e determinação em LC-MS/MS

As amostragens e análises cromatográficas foram realizadas em colaboração com o LABIFI-UERJ e com o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD-UFRJ).

Cocaína e benzoilecgonina foram analisadas nas amostras a partir de filtração em microfibras de vidro ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$), nova filtração em membrana de acetato de celulose (0,2

$\mu\text{mol L}^{-1}$) e extração em fase sólida com cartuchos Oasis HLB® (6 mL, 500 mg) (adaptado de CAMPESTRINI; JARDIM, 2017). O acondicionamento dos cartuchos HLB foi realizado com 5 mL de MeOH e 5 mL de água ultrapura. Aliquotas de 250 mL das amostras foram percoladas pelos cartuchos no fluxo aproximado de 5 mL min^{-1} . Após percolação, a etapa de clean up consistiu na percolação de 5 mL de água ultrapura. Os cartuchos foram secos à vácuo por 10 min e eluidos com 6 mL de uma solução MeOH:ACN, 95:5 (v/v). Em seguida, foi procedida a etapa de evaporação até a secura sob corrente de nitrogênio (adaptado de CAMPESTRINI; JARDIM, 2017; MALDANER et al., 2012). O extrato seco foi ressuspendido para um volume final de 1,25 mL (resultando na concentração final da amostra em x200), com uma solução água:metanol, 70:30 (v/v), contendo formiato de amônio ($3,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e ácido fórmico (0,1%) como aditivos, transferindo-se a solução final para os frascos, para análise em LC-EMAR.

A identificação e quantificação de cocaína e benzoilecgonina foi realizada através da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida Dionex 3000 UHPLC (Thermo Scientific), com uma coluna Thermo Scientific Synchronis (Thermo Scientific) C18 ($1.7 \mu\text{m}$, $50 \times 2.1 \text{ mm}$), mantida à temperatura constante de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Nas condições iniciais de análise, a fase móvel (A) foi composta de solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e 5 mmol L^{-1} de formiato de amônio, enquanto a fase móvel (B) consistiu em solução metanólica, também contendo 0,1 % de ácido fórmico. Uma condição do tipo gradiente com um fluxo constante de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ foi adotada. Antes da aplicação do gradiente, a coluna foi mantida em uma condição isocrática com 5 % de B por 0,3 min. O gradiente seguiu as seguintes condições: aumento para 10 % de B entre 0,3-0,5 min; 25 % de B de 0,5-1 min; 90 % de B de 1-6 min, e 100 % de B de 6-8 min. A condição isocrática de 100% B foi mantida até 9 min, reduzindo para 5 % em 9,1 min e mantida nesta condição até 12 min. O volume de injeção foi de $5 \mu\text{L}$. Foi utilizado um espectrômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), com ionização do tipo electrospray (ESI). As condições de ionização consistiram em uma voltagem de 3.9 kV (+) e 3.9 kV (-); temperatura de capilar de $380 \text{ }^\circ\text{C}$; *S-lens* com RF 90; *sheath gas* em 40 (unidades arbitrárias); gás auxiliar em 5 (unidades arbitrárias). O equipamento foi operado em modo de aquisição total (*full scan*) em modo positivo, intervalo de massas de m/z 100–800 e resolução de 70 K unidades. Adicionalmente, foi realizado um experimento de fragmentação total (*all ion fragmentation* - AIF), em modo positivo, adquirindo no intervalo de m/z 80–800 e resolução de 17,5 K unidades. O monitoramento dos íons foi realizado em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ para m/z 304,15433 com tempo de retenção esperado de 4,44 minutos para cocaína e m/z 290,13868

com tempo de retenção esperado de 4,36 minutos para benzoilecgonina (intervalo de tolerância de 0,1 min).

Para a quantificação, foi adotada a estratégia de padronização interna (PI) adicionando material de referência cocaína-d3 (COC-D3) às amostras, adquirido de Cerilliant (Austin, TX, EUA). Uma curva analítica foi construída para ambos os analitos (COC e BE) utilizando pool de amostras de água de rio, conforme as concentrações 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng mL⁻¹ para COC (considerando-se $r^2 > 0,99$) e 50, 75, 100, 250, 500 e 750 ng mL⁻¹ para BE (considerando-se $r^2 > 0,99$) (Nº de injeções = 5). Quando necessário, os resultados das amostras foram comparados com uma curva de baixa concentração de 5 pontos ($r^2 = 0,990$ para COC e 0,994 para BE), semelhante ao aplicado por Campestrini e Jardim (2017). As razões área do analito/área do PI foram utilizadas nas estimativas das concentrações.

Foram realizados testes para determinação de parâmetros de performance do método de quantificação. Para tanto, foram preparadas curvas de área do analito sobre área do padrão interno deuterado (COC-D3), nas concentrações 1, 2, 5, 10, 25, 50 e 75 (ng mL⁻¹) para COC e 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 (ng mL⁻¹) para BE. As curvas foram preparadas utilizando como solventes (A) proporção 70:30 de fase móvel A: fase móvel B e (B) pool de água dos cinco pontos de coleta, servindo de base ao ensaio de recuperação a partir de soluções de padrão analítico de COC e BE (25 ng mL⁻¹).

Os ensaios de recuperação foram realizados nas duas nas matrizes (água ultrapura e água de rio) visando efeito comparativo, culminando na investigação da eficiência do método. Dessa forma, o ensaio de recuperação (Equação 1) foi realizado utilizando as concentrações iniciais (de baixa e de alta) de 50 e 125 ng L⁻¹ de analito em 250 mL de cada matriz, concentrando-se x200 após a extração (n=3). O intervalo de recuperação adequado foi considerado entre 50-120 % de recuperação (adaptado de EPA, 2016). COC-d3 foi utilizada como PI (concentração inicial de 0,05 µg L⁻¹), sendo adicionada aos 250 mL de solução previamente ao procedimento de extração.

Equação (1)

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C.SPE \times 100}{(CN.SPE \times CPDinj) \times CN.PD^{-1}}$$

Onde:

C.SPE = Concentração de analito obtida após SPE;

CN.SPE = Concentração nominal do ponto de baixa ou de alta na SPE;

CPDinj = Concentração de padrão analítico obtida após injeção direta;

CN.PD = Concentração nominal do padrão analítico na injeção direta.

A precisão (Equação 2) e a exatidão (Equação 3) do método foram calculadas conforme o desvio padrão relativo das injeções durante o ensaio de recuperação e a relação entre concentração obtida e nominal em cada faixa testada (10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$), conforme ANVISA (2003).

Equação (2)

$$\text{Precisão (\%)} = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Equação (3)

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{CMD}{CNom}$$

Onde:

DP = desvio padrão da concentração obtida após SPE;

CMD = Concentração média obtida após SPE;

CNom = concentração nominal (de baixa ou de alta) aplicada.

Os limites de detecção (sensibilidade) (LD) e de quantificação (LQ), compreendidos como a menor concentração de analito que pode ser detectada e a menor que pode ser quantificada no método, respectivamente, foram calculados conforme ANVISA (2003), pela relação entre intercepto e inclinação da reta calculada na curva analítica (Equações 4 e 5). Assim foram utilizadas 3 curvas na matriz água de rio, geradas ao longo das coletas realizadas ($n = 3$), as quais, também apontaram o coeficiente de determinação (r^2) demonstrado na sessão resultados deste documento.

Equação (4)

$$LD = \frac{DP \cdot \text{Intercep} \times 3}{MD \cdot \text{Inc}}$$

Equação (5)

$$LQ = \frac{DP \cdot \text{Interc} \times 10}{MD \cdot \text{Inc}}$$

Onde:

DP,Intercep = desvio padrão do intercepto calculado na curva analítica;

MD,Inc = média da inclinação da curva analítica;

4.3. SEGUNDA ETAPA: ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM ZEBRAFISH

Concentrações ambientalmente relevantes de COC e BE foram utilizadas como parâmetro para aplicação dos ensaios ecotoxicológicos. O Quadro 3 da sessão 3.2.1 (detecção ambiental de COC e BE no Brasil) serviu como ponto de partida para o planejamento das concentrações utilizadas no ensaio com os embriões (Quadro 7). Já as concentrações utilizadas no ensaio com peixes adultos foram adotadas a partir das aplicas por Parolini et al. (2017) (Quadro 9).

4.3.1. Ensaio de toxicidade aguda com embriões de *zebrafish* (FET Test)

O ensaio para avaliação da toxicidade aguda em embriões de *zebrafish* foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotério *Zebrafish* INCQS/FIOCRUZ, conforme adaptação do protocolo n. 236 da OECD (OECD, 2013). Os protocolos n. 16/2019 (Criação e Manejo do *Zebrafish* – *Danio rerio*) e 17/2019 (Teste de Toxicidade Aguda em Embrião de Peixe – FET test) foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Fiocruz.

Os embriões recém-fertilizados e viáveis, obtidos no Serviço de Animais de Laboratório do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, Fiocruz) foram expostos às substâncias de interesse e avaliados quanto aos efeitos tóxicos por um período de 96 h de desenvolvimento embrionário.

O *Fish Embryo Toxicity Test* (FET Test) foi iniciado com o acasalamento dos animais, a partir de desova em tanques individuais seguindo a proporção 2:1 (macho:fêmea). Os peixes adultos foram separados em tanques individuais, culminando na desova (início do ciclo seguinte de iluminação) e recolhimento dos ovos (adaptado de OECD, 2013). Os ovos fecundados foram selecionados aleatoriamente com pipeta descartável, em detrimento dos ovos coagulados (destinados ao descarte). A exposição dos embriões às concentrações de COC e BE foi realizada conforme descrito no Quadro 7 e visando preservar o início da exposição preferencialmente antes de 90 minutos pós-fertilização (1,5 hpf).

Quadro 7: Planejamento das exposições dos embriões de *zebrafish* COC e BE.

Tipo	COC (ng L ⁻¹)	BE (ng L ⁻¹)	Id.
Controle meio cult.	0	0	1
MeOH	0	0	2
COC-50	50		3
COC-500	500		4
COC-1000	1000		5
COC-2000	2000		6
COC-3000	3000		7
COC-5000	5000		8
BE-50		50	9
BE-500		500	10
BE-1000		1000	11
BE-2000		2000	12
BE-3000		3000	13
BE-5000		5000	14

Para a execução do ensaio foram utilizadas placas de plástico com 24 poços (em duplicada), com alojamento de um embrião por poço e trocas diárias do volume total de solução, conforme método semi-estático, visando manter as concentrações de COC e BE ao longo das 96h de ensaio (adaptado de PAROLINI et al., 2017). As diluições das substâncias testadas foram realizadas com a mesma solução utilizada como “meio embriônico”, a partir de soluções de padrões de COC e de BE em MeOH, preconizando aplicar-se o mesmo volume de solução de padrão em cada poço (500 µL). O volume total de meio embriônico + solução padrão em cada poço totalizou 2 mL (adaptado de PAROLINI et al., 2017). A solução meio embriônico foi preparada a partir da água reconstituída, conforme descrito em OECD 236/13, correspondendo à grau de dureza equivalente a 100-300 mg L⁻¹ CaCO₃, 26 ±1 °C e pH 6,5-8,5 (OECD, 2013).

Para o controle negativo foi utilizado apenas meio embriônico, o qual serve como parâmetro, viabilizando o teste quando observada mortalidade dos embriões inferior a 10 % (OECD, 2013). A viabilidade dos ensaios foi também confirmada quando observados efeitos teratogênicos e morfológicos em menos de 10 % dos embriões dos controles de meio embriônico à 72 h de experimento (GUARIENTI et al., 2014). Foi também realizado uma exposição à MeOH, visando observar efeitos que seriam provenientes da ação do solvente sobre os embriões. Já o controle positivo preconizado no guia da OCDE, onde se exige a mortalidade entre 20 e 80% dos animais, não foi realizado neste trabalho, por ser contrário aos princípios dos 3Rs de redução e refinamento.

Os embriões foram analisados a cada 24 h (24, 48, 72 e 96 h) em uma lupa com controle de temperatura Leica S9i (Leica Microsystems Ltd., Italy), registrando-se observações apicais como indicadores de letalidade: (1) coagulação de ovos fertilizados, (2) falta de formação de somito, (3) falta de desprendimento do broto da cauda do saco vitelínico e (4) falta de batimentos cardíacos, bem como (5) malformações das regiões ventral e pericárdio. No final do período de exposição, a toxicidade aguda foi determinada com base em resultados positivos em qualquer uma das observações apicais registradas, aplicando-se o sistema de *scores* conforme o Quadro 8 (adaptado de GUARIENTI et al., 2014).

Quadro 8: Sistema de *scores* de efeitos aplicáveis aos embriões expostos

<i>Endpoints</i>	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Pontuação
Atrasos na formação	1	1	1	1	4
Edema no pericárdio	1	1	1	1	4
Edema / inchaço no saco vitelínico	1	1	1	1	4
Malformação da cauda/vértebra	1	1	1	1	4
Baixa resposta ao toque	1	1	1	1	4
Score por dia	5	5	5	5	20

Obs₁.: Casos de evento de morte receberam *score* conforme a pontuação máxima de efeitos observáveis para até a respectiva etapa do ensaio, compreendendo-se *score* = 5 quando verificada morte nas primeiras 24 h, *score* = 10 para 48 h, *score* = 15 para 72 h e *score* máximo de 20 para 96 h. Casos de deformação generalizada receberam *score* = 3 / dia.

Obs₂.: Adaptado de Guarienti et al (2014).

O descarte de carcaças dos embriões foi estabelecido por CONCEA (2023), compreendido em acondicionamento em sacos plásticos específicos para descarte de material biológico, sendo posteriormente selados, identificados, congelados (-18 °C) e encaminhados à autoclavarão e incineração (CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2023).

4.3.2. Ensaio de toxicidade crônica com *zebrafish* adulto

Zebrafish adultos (3 cm ±1cm) foram fornecidos por vendedores especializados e mantidos em tanques de manutenção (150 L, 100*40*40 cm) para aclimação por 7 dias,

conforme os parâmetros pH 7-7,6, temperatura 23-27 °C, dureza da água em 10-60 mg CaCO₃ L⁻¹, NH₄⁺ < 0,05 mg L⁻¹, NO₂⁻ < 0,1 mg L⁻¹ aeração constante, densidade máxima de 1 g L⁻¹ (gramas de peixe:Litros de água), fotoperíodo de 12/12 h por dia e alimentação duas vezes ao dia com ração *Zeigler adult zebrafish irradiated diet 1.0 mm* (Pensilvania, EUA) (adaptado de BRASIL. ABNT NBR 15088/16, 2016; OECD 203, 1992; SCHNEIDER et al., 2009). Após aclimatação, 36 peixes (comprimento 4,17 ± 0,35 cm e massa 2,26 g ± 0,45 g) foram transferidos para aquários de exposição de 36 L (49,5*30*24,5 cm), contendo água do aquário de manutenção fortificada com COC ou BE, utilizando como base as concentrações ambientais aplicadas por Parolini et al. (2017), contando também com duas exposições mistas de COC e BE (Quadro 9). O ensaio de toxicidade crônica com peixes *zebrafish* adultos está amparado pela licença L-001/2023 referente ao protocolo CEUA/IOC-035/2022 da Fundação Oswaldo Cruz (Anexo I).

Quadro 9: Planejamento das exposições dos peixes *zebrafish* adultos.

Tipo	COC (ng L ⁻¹)		BE (ng L ⁻¹)		Id.
Controle	0	+	0		1
	10	+	0		2
Unitárias	1000	+	0		3
	0	+	10		4
	0	+	1000		5
Misturas	10	+	1000		6
	1000	+	10		7

Os ensaios totalizaram 21 dias de exposição, com troca de 50 % do volume da solução a cada 48 h (sistema semi-estático) para manutenção da concentração dos contaminantes avaliados (GE et al., 2015) e parâmetros da água supracitados (BRASIL. ABNT NBR 15088/16, 2016). O aquario controle foi submetido aos mesmos procedimentos, porém sem adição de contaminantes. A cada sete dias, 12 peixes foram separados (aleatoriamente) com um puça após a redução do volume de água do aquário, de forma a facilitar a captura. Em seguida os peixes foram individualmente eutanasiados por meio de imersão em banho de água com gelo (0 a 4 °C) (sem que estes tenham contato direto com o gelo) por 10 minutos até a perda de movimentos operculares, seguindo-se a decapitação e inserção de agulha metálica na porção cerebral, conforme estabelecido por normas nacionais e internacionais (AVMA, 2013; BORSKI; HODSON, 2003; CCAC, 2005; CONCEA, 2015).

Quanto à perfuração craniana, a RN nº 37/2018 do CONCEA, no parágrafo 8.14.17.1, define que deve ser realizada por “um instrumento perfurante fino, pontiagudo e afiado [...] introduzido com força e rapidez para produzir depressão imediata do SNC”. No mesmo parágrafo, a RN nº 37 indica que a metodologia de perfuração craniana deve ser aplicada “como método complementar, após o uso de um outro método que garanta a inconsciência do animal”. Assim, dada a característica dos *endpoints* (efeitos subclínicos de estresse oxidativo à nível celular em órgãos) avaliados, não foi aplicado o uso de substância externa, visando que os resultados bioquímicos não sejam afetados. A eutanásia foi realizada em ambiente que não permite que outro animal assista o procedimento e os objetos utilizados foram limpos antes da entrada de cada animal.

Uma vez que não há guilhotinas especializadas para a eutanásia de peixes de 3 cm de comprimento (estágio adulto), assim como para roedores neonatais (AVMA, 2013, pág. 39), o procedimento foi realizado conforme a indicação do referido protocolo, por meio do uso de lâminas afiadas. No caso deste estudo, foi utilizado um bisturi com lâmina de 2,5 cm de comprimento. Quanto à agulha metálica utilizada, embora nenhum dos protocolos supracitados estabeleça parâmetros específicos, uma vez considerado o pequeno porte do peixe *zebrafish*, uma agulha do tipo 21G foi utilizada.

Cérebro e fígado (pools de 12 cérebros e pools de 12 fígados a cada semana) foram recolhidos e armazenados à -20 °C para posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo: enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), tióis totais (TOT), glutathione-S-transferase (GST), peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PC).

Os animais foram considerados como potencialmente infectados. As carcaças foram autoclavadas para posterior descarte em lixo biológico para aterro sanitário controlado, conforme programa de gerenciamento de resíduos sólidos do LAPSA/IOC (carcaça descartada em lixo biológico infectante).

i. Análises de biomarcadores de estresse oxidativo em fígado e em cérebro

As avaliações de níveis de estresse oxidativo no cérebro e no fígado dos peixes foram realizadas conforme protocolos já preestabelecidos no laboratório de ecotoxicologia do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/IOC). Dessa forma, os níveis de estresse oxidativo foram determinados pela avaliação dos níveis dos biomarcadores SOD, CAT, TOT, GST, MDA e PC nas amostras de fígado e cérebro dos peixes. Todas as análises foram normalizadas por meio de determinação de proteínas totais nas amostras de fígado e cérebro.

(a) Determinação de proteínas

A determinação de proteínas totais, utilizada como fator de correção (normalização) das análises de biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos de cada amostra, foi realizada de acordo com adaptação do método de Lowry et al. (1951) modificado por Peterson (1977). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi misturada à 980 µL de água ultrapura, seguida da adição de 400 µL de reativo A, composto por 12,5 mL água ultrapura, 12,5 mL de NaOH 0,8 mol L⁻¹, 12,5 mL de solução de SDS 10 % e 12,5 mL de solução CTC (1,25 g de carbonato de sódio, 0,250 g de tartarato de sódio e potássio e 0,125 g de sulfato de cobre, avolumados para 12,5 mL com água ultrapura). Na sequência, foram adicionados 200 µL de reativo B (solução 20 % de Follin ciocalteu fenol 2N) à mistura, seguindo-se a incubação por 30 minutos no escuro. Por fim, a quantificação de proteínas totais foi realizada comparando-se os valores (de absorbância à 750 nm, em leitor de microplaca) da amostra com os de uma curva analítica preparada com solução de 2,0 mg mL⁻¹ de BSA e água ultrapura. A análise foi realizada em leitor de microplaca LTEK INNO (Gyeonggi-do, Coreia do Sul) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg mL⁻¹ (solução BSA 2 mg mL⁻¹:água deionizada). Resultados expressos em µg µL⁻¹ (proteína:lisado de tecido).

(b) Determinação de superóxido dismutase (SOD)

A determinação do biomarcador SOD foi realizada via Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company, EUA). O kit utiliza sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, após procedimento de extração nas amostras de cérebro e fígado. O procedimento de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Em seguida, foi realizada a análise de SOD. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da dismutação do radical superóxido. O meio reacional foi composto por 200 µL de detector de radicais + 10 µL de amostra (diluição x1). A reação foi iniciada com 20 µL de xantina oxidase. Uma curva de calibração foi preparada com padrão de

SOD e a leitura das amostras e padrões foi realizada à $\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$. Os resultados das amostras de biomassa foram expressos na unidade internacional de atividade enzimática (U) e em função da quantidade de proteína presente na amostra correspondente (U.g.ptn^{-1}).

(c) Determinação de catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Aebi (1984). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4°C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de $121 \mu\text{L}$ do sobrenadante foi misturada à $1089 \mu\text{L}$ de água ultrapura. A determinação da cinética enzimática da enzima catalase (CAT) foi realizada por meio da quantificação do consumo de H_2O_2 (Reação 1) à absorvância de 240 nm ($\Delta\text{Abs min}^{-1}$) em espectrofotômetro Bel Photonics UV-M51 (São Paulo, Brasil), durante 15 segundos, em duas cubetas de quartzo, uma denominada como cubeta referência e outra como cubeta amostra.



As análises foram procedidas com a adição de $200 \mu\text{L}$ de tampão fosfato e $400 \mu\text{L}$ de amostra na cubeta de referência, seguindo-se a adição de $200 \mu\text{L}$ de solução de H_2O_2 (1:299 H_2O_2 :água) e $400 \mu\text{L}$ de amostra na cubeta de amostra, respeitando-se a ordem descrita dos reagentes, visando evitar a ocorrência da reação de degradação antes do início da leitura no espectrofotômetro. Resultados expressos na unidade internacional de atividade enzimática (U) e em função da quantidade de proteína ($\text{U CAT por g de Ptn}$).

(d) Determinação de glutationa-S-transferase (GST)

A determinação da atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) foi quantificada a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Habig, Pabst e Jakoby (1974). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à

4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 52 µL do sobrenadante foi misturada à 208 µL de água ultrapura para as análises de cérebro e uma alíquota de 26 µL do sobrenadante foi misturada à 234 µL de água ultrapura para as análises de fígado. A atividade da enzima foi monitorada por meio da formação do composto GS-DNB (Reação 2) à absorvância de 340 nm ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) em espectrofotômetro Bel Photonics UV-M51 (São Paulo, Brasil), durante 60 segundos, a partir da mistura de 1350 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5, 50 µL de GSH 50 mmol L⁻¹, 50 µL de amostra e 50 µL de CDNB 25 mmol L⁻¹ em uma cubeta de quartzo (homogeneizando-se com a pipeta nesta etapa).



Os cálculos de atividade enzimática foram baseados na Equação 6, na qual será utilizada a unidade internacional de atividade enzimática (U), que equivale à formação de 1 µmol de GS-DNB/min. Resultados expressos em U GST por g de Ptn.

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{\varepsilon} \times \text{Volume da cubeta (final)} = \frac{\left(\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min Am}} - \frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min Br}}\right) \times 3 \text{ mL}}{9,6} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde,

$$U = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times 0,3125 \rightarrow (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ na cubeta})$$

$$U/\text{mL} = U \times 10$$

$$U/L = (U \text{ mL}^{-1}) \times 1000$$

$$\text{Volume de amostra} = 0,1 \text{ mL}$$

(e) Determinação de tióis totais (TOT)

O biomarcador tióis totais foi quantificado a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Beutler, modificado por Wilhelm Filho et al. (2005). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 175 µL do sobrenadante foi misturada à 175 µL de água ultrapura, seguida da adição de DTNB 0,25 mmol L⁻¹ (DTNB: tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 8), seguindo-se a incubação por 15 minutos no escuro. Por fim, a

quantificação de TOT foi realizada comparando-se os valores (de absorvância à 412 nm, em leitor de microplaca) da amostra com os de uma curva analítica de solução estoque de 10 mmol L⁻¹ de GSH (glutathiona reduzida) (GSH:tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7). A análise foi realizada em leitor de microplaca LTEK INNO (Gyeonggi-do, Coreia do Sul) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 5, 10, 15, 20 30, 60 e 90 μmol L⁻¹ (GSH:tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7). Resultados expressos em μmol de TOT por grama de tecido, normalizados por grama de proteína (μmol g⁻¹ por g Ptn).

(f) Determinação de malondialdeído (MDA)



(Leitura da absorvância em $\lambda = 532 \text{ nm}$)

O biomarcador MDA foi quantificado a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme adaptação do protocolo específico descrito pelo Kit TBARS Assay, fornecido por Cayman Chemical Company (Michigan, EUA). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 75 μL do sobrenadante foi misturada à 75 μL de água ultrapura, seguida da adição de 150 μL de ácido tricloroacético 10 % (TCA) e de 1200 μL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,53 % (TBA) (constituída de TBA diluído em solução 1:1 de AcOH 20 % e NaOH 0,7 mol L⁻¹). A quantificação de MDA foi realizada comparando-se os valores (em espectrofotômetro) da amostra com os de uma curva analítica preparada com solução de MDA 100 μmol L⁻¹ em água ultrapura (total de 150 μL de solução), seguida da adição de 150 μL de TCA 10 % e de 1200 μL de solução de TBA 0,53 %. Após preparo da amostra de da curva analítica, ambos foram mantidos por 1 hora em termobloco Benfer B-BTB (São Paulo, Brasil) à 90 °C, seguido de banho de gelo por 10 min e centrifugação por 10 min à 1600 x g (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5430R (Hamburgo, Alemanha). A análise foi realizada à 535 nm de absorvância em leitor de microplaca LTEK INNO (Gyeonggi-do, Coreia do Sul) e as concentrações utilizadas na curva analítica corresponderam a 1, 2, 4, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μmol L⁻¹ de MDA em água. Resultados expressos em μmol L⁻¹ de MDA, normalizados por grama de proteína (μmol L⁻¹ por g Ptn).

(g) Determinação de carbonilação de proteínas (PC)

O biomarcador proteína carbonilada (PC) foi quantificado a partir da amostra de órgão após a dissecação, conforme o protocolo de Mesquita et al. (2014). A aplicação do método foi compreendida pelas fases de extração e de quantificação do biomarcador nas amostras. A fase de extração consistiu na homogeneização da amostra em tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ à pH 7 (contendo fosfato de potássio monobásico e fosfato de sódio dibásico), seguida de centrifugação por 10 min à 10.000 rpm (à 4 °C) em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5425R (Hamburgo, Alemanha) (YAN et al., 2015). Após esse procedimento, na fase de quantificação, uma alíquota de 110 µL do sobrenadante foi misturada à 440 µL de água ultrapura. Na microplaca foram adicionados 80 µL de DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazina 10 mmol L⁻¹) e de 80 µL de amostra, seguido de inoculação por 10 min em temperatura ambiente, adição de 40 µL de NaOH 6M, homogeneização com pipeta, nova inoculação por 10 min e leitura à 450 nm em leitor de microplaca LTEK INNO (Gyeonggi-do, Coreia do Sul). A leitura de branco consistiu em 80 µL de amostra adicionados à 80 µL de solução de H₃PO₄ 0,5 mol L⁻¹, seguindo-se o mesmo processo aplicado às demais leituras. Resultados expressos em µmol de PC por grama de tecido, normalizados por grama de proteína (µmol g⁻¹ por g Ptn).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Graphpad Prism versão 9.5.1, a partir dos resultados do teste Shapiro-Wilke de normalidade dos dados e pelo teste de homogeneidade de variância Brown-Forsythe, considerando-se diferença significativa para $p < 0,05$ e normalidade da distribuição correspondendo à hipótese nula. A partir desse ponto, foi aplicado o teste paramétrico ANOVA ($p \leq 0,05$) seguido do teste *post-hoc* Tukey de comparações múltiplas (dados de monitoramento) ou Dunnett (comparação entre grupos expostos e controle). A análise de componentes principais (ACP) foi realizada com os resultados das análises de biomarcadores de sistema antioxidante e de estresse oxidativo no ensaio crônico com peixes adultos. As variáveis foram denominadas conforme a abreviação dos biomacadores SOD, CAT, GST, GSH (TOT), MDA e PC, seguidas da abreviação de cérebro (CER) e de fígado (FIG), especificando o órgão correspondente à análise do biomarcador, bem como os contaminantes estudados (COC ou BE) e suas misturas (MIX). A força da correlação de Pearson ou de Spearman (dependendo da normalidade) utilizada na ACP foi definida de acordo com Fávero e Belfiore (2015). A adequação da ACP foi determinada pelo método de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO). As variáveis que não obtiveram adequação conforme o método de KMO foram retiradas da ACP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MONITORAMENTO DE ÁGUAS FLUVIAIS

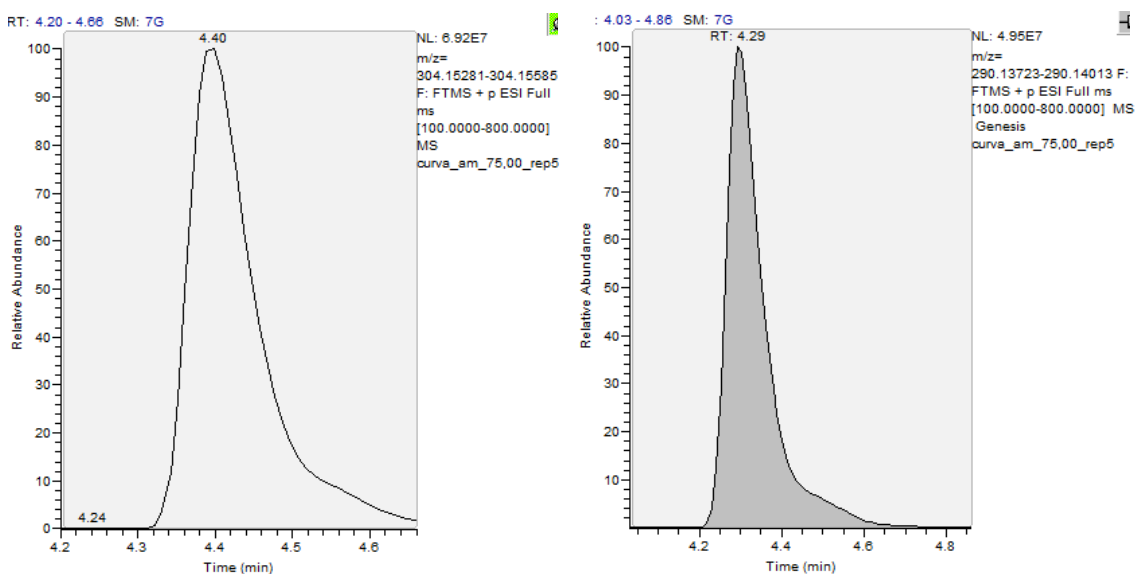
Oito campanhas de monitoramento foram realizadas nos pontos de coleta Canal do Cunha, Canal do Mangue, Rio Carioca, Rio Irajá e Rio Meriti, resultando em 4 campanhas na estação seca (maio/2022, julho/2022, agosto/2022 e setembro/2022) e 4 campanhas na estação chuvosa (outubro/2022, novembro/2022, dezembro/2022 e janeiro/2023).

A partir dos ensaios para delimitação dos parâmetros de performance do método (descritos abaixo), foram obtidas as concentrações de COC e BE nos rios investigados, as quais foram contrastadas com índices pluviométricos e de parâmetros físico-químicos a serem relatados nos tópicos subsequentes.

5.1.1. Performance do método de detecção de COC e BE

Os ensaios preliminares para validação do método de detecção de COC e BE, comparando leituras em pool de água de rio com leituras em água ultrapura, considerando a coluna Thermo C18 (50x2,1 mm e 1,7 μ) e SPE com cartuchos Oasis HLB, resultaram nos cromatogramas apresentados na figura 12 e nos parâmetros de qualidade de método descritos na Figura 13.

Figura 12: Cromatogramas representativos das análises de COC e BE em água de rio.



Cocaína e BE foram quantificadas nas amostras de água de rio a partir da metodologia proposta, considerando-se m/z 304,15433 para COC, com RT 4,44 minutos (intervalo de

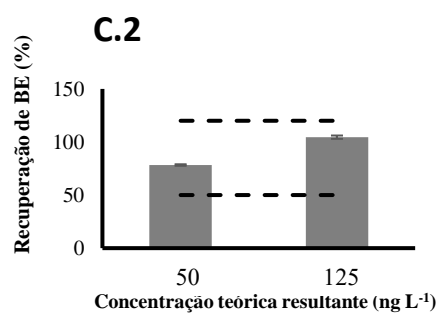
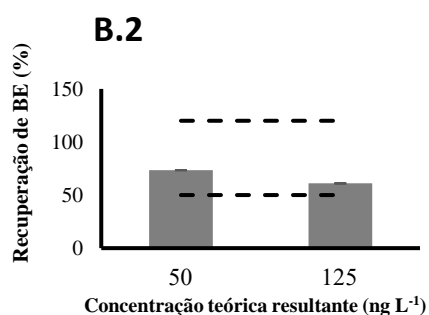
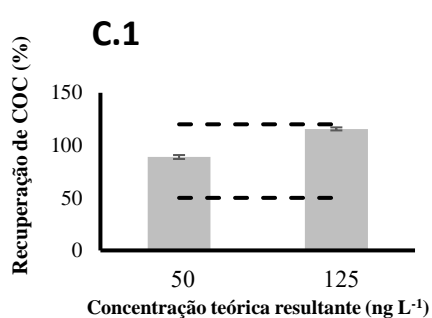
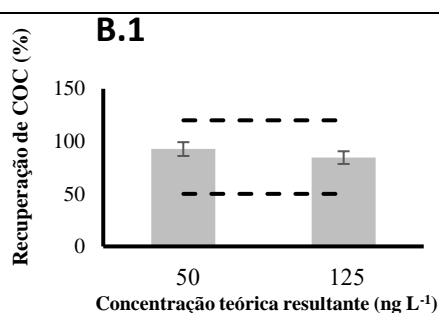
confiança de RT = 0,1 min) e m/z 290,13868 para BE, com RT 4,36 minutos (intervalo de confiança de RT = 0,1 min), conforme representado na Figura 12 e ANEXO IV.

Figura 13: Parâmetros de performance do método, utilizando 50 e 125 ng L⁻¹ como concentrações de preparo de baixa e de alta no ensaio de recuperação, sendo concentradas x200 após procedimento SPE. A = Parâmetros de qualidade do estudo; B.1 e B.2 = Recuperação de cocaína e benzoilecgonina em água de rio, respectivamente; C.1 e C.2 = Recuperação de cocaína e benzoilecgonina em água ultrapura, respectivamente; N = 3 replicatas; DPR = Desvio padrão relativo; LD = Limite de detecção; LQ = Limite de quantificação; r^2 = coeficiente de determinação; Linha tracejada = faixa adequada de performance de recuperação (50-120 %).

A.

	Matriz água de rio				Matriz água ultrapura		
	[] Teóricas (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)	Recuperação (%)	Precisão (DPR %)	Exatidão (%)
COC	50	92,63	7,09	61,00	88,87	2,10	56
	125	84,50	7,15	55,00	115,62	1,25	73
BE	50	73,37	4,76	58,00	78,29	0,91	52
	125	60,96	13,82	48,00	104,54	1,49	69

	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	r^2
COC	8,94	29,80	0,9985
BE	3,09	10,29	0,9987



O método aplicado, considerando a aplicação da coluna Thermo C18 (diâmetro 50x2,1 mm e tamanho de partícula 1,7 μ m) e procedimento SPE com cartuchos Oasis HLB, resultou

em parâmetros de performance do método considerados adequados, conforme estabelecido na metodologia deste documento.

A recuperação observada no método manteve-se entre 84-92 % para COC e 60-73 % para BE, com recuperações mais próximas de 100 % para a menor concentração testada (50 ng L⁻¹) na matriz água de rio. Portanto, apesar da observação de um efeito de matriz de supressão de sinal, as recuperações em água de rio foram consideradas adequadas dentro do intervalo adotado de 50-120 % (adaptado de EPA, 2016), à exemplo do relatado por Campestrini e Jardim (2017) em sua investigação (recuperação de 69-97 %) de níveis de cocaína em águas superficiais em São Paulo/Brasil. Os resultados de recuperação do presente estudo também estão em acordo com o estudo de Shihomatsu et al. (2017), que investigaram níveis de COC e BE em águas superficiais em São Paulo, considerando a faixa de recuperação entre 55-105 %. Cocaína e BE em águas superficiais também foram investigados por Watanabe et al. (2020), observando efeitos de supressão e de aumento de sinal relacionados à matriz, pelas recuperações de COC na faixa de 28,9-59,6 % e de BE na faixa de 166,7-217,9 %, (WATANABE et al., 2020). Apesar das diferenças entre os estudos supracitados, destaca-se que a matriz investigada, águas superficiais com a presença de esgotos, abarca um mix complexo de contaminantes, enfatizando-se os efeitos de supressão de sinal observados nos três estudos.

Já para água ultrapura, não foi observado um padrão para resultados de recuperação mais próximos de 100 %. Apesar disso, a matriz água ultrapura resultou em melhores índices de precisão (0,91-1,25 %) em relação à água de rio (4,76-13,82 %), possivelmente justificado pela presença de interferentes contidos na matriz ambiental. Mesmo com essa diferença, a precisão do método para água de rio manteve-se dentro dos valores limitantes (< 15 %) estipulados pela RN 899/03 da ANVISA (2003). O parâmetro exatidão resultou em níveis próximos entre as duas matrizes para a relação entre concentração obtida e nominal, com 48-61 % para os analitos em água de rio e 52-73 % em água ultrapura. Os resultados de exatidão do método, entretanto, apontam para a necessidade de uma interpretação cautelosa da detecção de COC e BE, considerando a inexatidão associada (Figura 13). Cocaína e BE mantiveram-se acima dos valores de LQ (Figura 13) em todas as campanhas de monitoramento, conforme demonstrado na sessão 5.1.3 deste documento (concentrações de COC e BE monitoradas).

5.1.2. Dados pluviométricos e parâmetros físico-químicos durante as campanhas

Dados pluviométricos das últimas 96 h até o momento da coleta em cada ponto amostral, obtidos no portal ALERTA RIO (2023), resultaram na Tabela 1, sendo apresentados agregados por estação chuvosa vs estação seca, para efeito de comparação. Da mesma forma, os

parâmetros físico-químicos analisados em cada coleta foram dispostos em estação seca vs chuvosa (Tabela 1). Os resultados detalhados desses parâmetros seguem descritos no anexo deste documento (Anexo II).

Tabela 1: Dados pluviométricos e resultados físico-químicos, conforme valores máximo, médio e mínimo de cada ponto de coleta durante estações seca e chuvosa. Resultados apresentados como valores máximo, médio e mínimo de cada ponto de coleta durante estações seca e chuvosa. Dados pluviométricos correspondem ao acumulado das últimas 96 h de chuvas na respectiva sub-bacia hidrográfica até momento da coleta.

	Pluviometria (mm m ⁻²)		Temperatura (°C)		pH		Condutividade (µs cm ⁻¹)		Salinidade (PSU)		N-NH ₃ (mg L ⁻¹)		N-Total (mg L ⁻¹)		DQO (mg L ⁻¹)		
	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	Estação seca	Estação chuvosa	
Canal do Cunha	Máx.	21,8	18,8	24,7	27,9	7,1	7,1	732,0	600,0	0,4	0,3	28,6	19,5	26,1	41,6	110,0	121,0
	Méd.	5,7	8,5	21,8	24,1	6,9	7,0	564,0	469,0	0,3	0,2	20,4	15,1	19,6	24,5	84,4	88,9
	Mín.	0,0	1,0	18,6	22,3	6,8	6,8	392,0	375,0	0,2	0,2	12,3	6,7	14,6	17,9	44,6	56,4
Canal do Mangue	Máx.	27,4	51,8	24,6	27,3	7,2	7,3	1700,0	4500,0	0,8	2,4	20,1	17,2	49,5	21,0	110,2	130,4
	Méd.	8,7	15,2	21,6	24,0	7,1	7,1	1392,0	2479,5	0,6	1,3	17,1	11,5	27,0	16,2	74,7	99,1
	Mín.	0,0	0,4	19,0	22,6	7,0	6,9	843,0	498,0	0,4	0,2	13,9	7,2	14,0	11,4	52,9	82,3
Rio Carioca	Máx.	53,8	61,4	25,0	28,2	7,3	7,4	3555,0	5174,0	1,9	24,8	15,4	12,4	15,8	12,4	280,7	744,2
	Méd.	16,0	16,8	22,1	23,9	7,1	7,2	1641,3	1519,9	0,9	7,0	10,4	7,2	13,1	8,8	173,5	257,0
	Mín.	0,0	0,4	20,3	22,1	7,0	7,0	274,0	38,6	0,1	0,2	3,8	0,9	10,8	3,5	116,6	61,6
Rio Irajá	Máx.	37,2	7,8	24,9	29,7	7,2	7,5	9154,0	3659,0	8,8	7,6	29,5	26,3	21,4	22,0	571,3	723,4
	Méd.	11,6	4,4	22,7	25,2	7,1	7,2	3727,8	1396,3	4,1	3,1	21,6	12,6	17,9	16,1	244,1	272,9
	Mín.	0,0	1,0	20,3	21,7	7,0	7,0	13,2	13,3	0,3	0,1	13,7	0,7	13,6	3,9	21,2	72,1
Rio Meriti	Máx.	39,4	8,0	26,8	32,0	7,2	7,2	7236,0	6896,0	4,0	3,8	33,7	23,9	26,3	22,2	439,8	203,1
	Méd.	15,5	5,6	23,5	26,3	7,2	7,1	4928,3	4767,8	2,7	2,6	25,3	16,1	20,7	19,9	324,0	171,5
	Mín.	0,0	4,0	21,2	23,1	7,1	7,0	904,0	1674,0	0,4	0,8	16,8	10,0	17,8	16,3	227,4	109,6
Média por estação	11,48	10,09	22,33	24,69	7,07	7,12	2450,66	2126,49	1,71	2,83	18,96	12,47	19,68	17,09	180,15	177,86	

Os dados pluviométricos indicaram, para as 96 h prévias à coleta, uma média de 11,48 mm m⁻² para a estação seca, enquanto 10,09 mm m⁻² foram observados na estação chuvosa (medianas 9,20 e 5,10 mm m⁻², respectivamente) (ANEXO II). Com isso, os pontos de coleta C. do Cunha, C. do Mangue e Rio Carioca apresentaram maiores valores pluviométricos médios na estação chuvosa (outubro/2022-janeiro/2023), enquanto os pontos Rio Irajá e Rio Meriti demonstraram maiores índices médios na estação seca (maio/2022-setembro/2022) (Tabela 1). Esses maiores índices na estação seca estariam relacionados ao observado para a coleta de setembro/2022, a qual apresentou maiores índices pluviométricos em relação à todas as coletas (ANEXO II). Rio Carioca e Canal do Mangue despontaram como os que receberam mais chuvas (mm m⁻²) durante as campanhas na estação chuvosa, enquanto na estação seca, Rio Carioca e Rio Meriti despontaram com os maiores índices. Uma vez que os contaminantes investigados neste estudo têm seu aporte nos ambientes aquáticos relacionado ao esgoto e, neste caso, esgotos clandestinos em rios, o parâmetro pluviometria relaciona-se com a “diluição” de níveis de COC e BE no corpo hídrico, com o carreamento de esgotos que estariam retidos nas galerias (aportando mais rapidamente nos rios) e com a mudança de temperatura do corpo hídrico investigado.

A temperatura dos rios investigados, assim como o pH, tem influência sobre a estabilidade de COC e BE. COC pode ser rapidamente hidrolisada à BE em temperatura ambiente (≈ 20 °C) em águas superficiais com pH em torno de 7-8 (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017; FONTES et al., 2019). COC pode ser hidrolisada à BE em função da temperatura, observando-se o aumento da concentração de BE juntamente com o decréscimo da concentração de COC (DEVAULT; LÉVI; KAROLAK, 2017). Por sua vez, BE apresenta maior estabilidade (transformação < 20 %), enquanto COC apresenta estabilidade em torno de 60-100 % (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017). Neste estudo, maiores temperaturas médias foram observadas nas águas coletadas na estação chuvosa (24,69 °C) em comparação com a estação seca (22,33 °C) (medianas 23,35 e 22,9 °C, respectivamente) (ANEXO II). O destaque na estação seca foi conferido às águas do Rio Meriti (23,5 °C) e do Rio Irajá (22,7 °C), repetindo-se na estação chuvosa com 26,3 e 25,2 °C, respectivamente. Já o parâmetro pH manteve-se em torno de 7 em todas as coletas, oscilando entre 6,8-7,5.

Maiores valores médios de condutividade foram observados principalmente na estação seca, resultando em 2450,56 $\mu\text{s/cm}$ contra os 2126,49 $\mu\text{s/cm}$ observados nas campanhas da estação chuvosa (medianas 1167,00 e 1137,00 $\mu\text{s/cm}$, respectivamente) (ANEXO II). Os maiores índices de condutividade média foram observados na estação seca para os rios Irajá (3727,8 $\mu\text{s/cm}$) e Meriti (4928,3 $\mu\text{s/cm}$), enquanto o Canal do Mangue e o Rio Meriti despontaram na

estação chuvosa (2479,5 e 4767,8 $\mu\text{s}/\text{cm}$, respectivamente). Semelhantemente, os rios Irajá (4,1 PSU) e Meriti (2,7 PSU) apresentaram maior salinidade na estação seca, enquanto os rios Carioca (7,0 PSU) e Irajá (3,1 PSU) indicaram os maiores índices na estação chuvosa. Condutividade e salinidade relacionam-se com a presença de íons na água, principalmente Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Cl^- , SO_4^{-2} , CO_3^{-2} e HCO_3^- (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013). Íons dissolvidos podem ser expressos como atividade iônica de uma solução em termos de sua capacidade de transmitir corrente elétrica (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013). Assim, a condutividade elétrica pode ser representada pela relação entre salinidade e temperatura da água (CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013). Condutividade e salinidade podem ser, portanto, influenciadas pelo movimento de marés (uma vez que a coleta foi realizada próxima à foz), intemperismo na sub-bacia hidrográfica e pelo aporte de efluentes clandestinos nos corpos hídricos, como efluentes de estação de tratamento de esgotos (BONDARENKO et al., 2017; CAÑEDO-ARGÜELLES et al., 2013).

Na campanha realizada em maio de 2022 foram analisados apenas os parâmetros associados à sonda multiparâmetros, sendo estabelecidas as demais análises (N-NH₃, N-Total e DQO) a partir da campanha seguinte, em parceria com o LABIFI-UERJ.

Quanto ao parâmetro N-NH₃, a Norma CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) estabelece valores limitantes conforme o enquadramento de classes de rios, determinando sua utilização apropriada. O portal INEA (2023) afirma que, no estado do Rio de Janeiro, apenas o Comitê de Bacia Hidrográfica do Rio Guandu possui rios enquadrados de acordo com a política Estadual de Recursos Hídricos. Por sua vez, o portal do Comitê de Bacia Hidrográfica da Baía de Guanabara (2023), reitera a informação, acrescentando que, embora proposto no Plano Diretor de Recursos Hídricos da Baía de Guanabara (PDRH, 2005), o enquadramento dos rios ainda não foi realizado, aguardando aporte de recursos para tanto e, portanto, “estes [rios] são considerados Classe 2, conforme o Art. 42º da Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005). Apesar disso, e dos 18 anos desde a publicação da CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005), enfatiza-se que os resultados de N-NH₃ obtidos neste estudo (médias majoritariamente acima de 13,3 mg L⁻¹) não são condizentes com os preconizados pela norma supracitada para rios classe 2, mas apresentam valores comparáveis aos associados à classe 4 de águas doces destinadas apenas à navegação e paisagismo. Decerto, o enquadramento de rios à classes estabelecidas pela Norma CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) não é estabelecido/alterado a partir dos níveis de parâmetros físico-químicos observados nesses corpos hídricos, contudo, altos níveis de N-NH₃, devem ser observados com cautela em termos da contaminação ambiental potencial. Neste estudo, apenas o Rio Carioca apresentou níveis médios de N-NH₃

abaixo de $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ em ambas as estações (seca e chuvosa), enquanto Canal do Mangue e Rio Irajá apresentaram médias abaixo de $13,5 \text{ mg L}^{-1}$ na estação chuvosa. Níveis de N-NH_3 na faixa de $12,1\text{-}60 \text{ mg L}^{-1}$ representam tipicamente os encontrados em esgotos domésticos (JORDÃO; PESSÔA, 2014). Com isso, todos os níveis médios de N-NH_3 obtidos neste estudo enquadraram-se aos esperados para esgotos domésticos, exceto Rio Carioca (estações seca e chuvosa) e C. do Mangue (estação chuvosa).

A demanda química de oxigênio (DQO) corresponde à quantidade necessária de oxigênio para oxidar a fração orgânica da amostra, variando tipicamente entre $200\text{-}800 \text{ mg L}^{-1}$ em esgotos domésticos (JORDÃO; PESSÔA, 2014). Neste estudo, os rios Irajá e Meriti apresentaram DQO média correspondente à esgotos domésticos em ambas as estações ($244,1$ e $324,0 \text{ mg L}^{-1}$ na estação seca e $272,9$ e $171,5 \text{ mg L}^{-1}$ na estação chuvosa, respectivamente), sendo também observado para o Rio Carioca na estação chuvosa ($257,0 \text{ mg L}^{-1}$). Elevados níveis de DQO (acima de 100 mg L^{-1}), por vezes, podem estar associados a características naturais de corpos hídricos, principalmente associados a águas negras como o Rio Negro (Manaus / AM) (LIN; BRAGA; YAMAWAKI, 2005). Apesar disso, dadas as características dos rios urbanos coletados, ressalta-se que os níveis de DQO monitorados neste estudo sugerem relação com uma carga orgânica proveniente principalmente do aporte de esgotos clandestinos.

O parâmetro DQO usualmente corresponde à cerca de 2x os níveis de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), cuja faixa de $100\text{-}400 \text{ mg L}^{-1}$ tipicamente é utilizada para representar esgotos domésticos (DBO 5 dias à $20 \text{ }^\circ\text{C}$) (JORDÃO; PESSÔA, 2014). A Resolução CONAMA 357/05 cita valores limitantes de DBO para águas doces até rios Classe 2 (máximo de 10 mg L^{-1} para DBO 5 dias à $20 \text{ }^\circ\text{C}$), não restringindo numericamente níveis de DBO para as Classes 3 e 4, porém aponta que estes limites poderão ser extrapolados caso estudo de capacidade de autodepuração do corpo receptor demonstre que a OD (oxigênio dissolvido) mínima estabelecida não será extrapolada (BRASIL, 2005). Neste estudo, a conversão direta dos dados de DQO resultaria em níveis de DBO acima de 100 mg L^{-1} nos rios Carioca, Irajá e Meriti em ambas as estações. Os parâmetros físico-químicos analisados neste estudo apresentaram indícios de degradação ambiental e presença de esgotos nas águas dos rios analisados, sobretudo associados aos níveis de N-NH_3 e DOQ tipicamente enquadrados ao esperado para esgotos domésticos. O quadro de degradação ambiental apresentado estaria relacionado, portanto, ao aporte de COC e BE nesses rios urbanos, a ser discutido a seguir.

5.1.3. Concentrações de COC e BE monitoradas

O monitoramento nos diferentes pontos de coleta revelou que COC e BE estiveram presentes em 100 % das coletas, em todos os rios amostrados, sempre acima do LQ calculado (LQ COC 29,80 ng L⁻¹ e LQ BE 10,29 ng L⁻¹) (Tabela 2, Figura 14 e ANEXO III).

Tabela 2: Concentrações gerais de COC e BE em valores máximo, médio e mínimo durante estações seca e chuvosa.

Substância		Estação seca	Estação chuvosa	média global	Frequência
COC (ng L ⁻¹)	Máx.	487,54	1089,96		
	Méd.	192,27	383,68	287,97	100 %
	Mín.	41,85	43,43		
BE (ng L ⁻¹)	Máx.	1576,51	2004,39		
	Méd.	504,30	1022,16	763,23	100 %
	Mín.	128,29	111,34		

A concentração média de COC observada neste estudo (287,97 ng L⁻¹) correspondeu à um nível 115 vezes maior que a observada por Watanabe et al. (2020) em águas superficiais nos EUA, e 150 vezes maior que a observada por Van Nuijs et al. (2009) para águas superficiais na Bélgica (Quadro 2). COC também foi detectada em outros estudos com águas superficiais na Espanha (34,2 ng L⁻¹), Hungria (0,3 ng L⁻¹) e Eslovênia (1,58-2,68 ng L⁻¹), demonstrando níveis abaixo dos observados no presente estudo (KONDOR et al., 2020; MASTROIANNI et al., 2016; VEROVŠEK et al., 2023). Já na comparação com estudos no Brasil, os níveis de COC observados superam em 364 vezes o relatado por Campestrini e Jardim (2017) para detecção em águas superficiais. COC foi detectada em água proveniente de galeria urbana para desague no mar em São Paulo, observando-se concentrações na faixa de 1,7-30,3 ng L⁻¹ (ROVERI et al., 2020, 2021). Entretanto, os níveis de COC neste estudo mantiveram-se abaixo dos 2650 ng L⁻¹ de COC relatados por Shihomatsu et al. (2017) no estado de São Paulo (Quadro 3).

É importante notar que a concentração máxima de 1089,96 ng L⁻¹ de COC observada neste estudo é maior que a detecta em afluente de ETE / esgoto bruto ao redor do mundo, considerando os trabalhos de Van Nuijs et al. (2009) (693 ng L⁻¹), Metcalfe et al. (2010) (823 ng L⁻¹) e Watanabe et al. (2020) (460 ng L⁻¹). A COC detectada neste trabalho (1089,96 ng L⁻¹) demonstrou-se próxima dos níveis detectados em afluente de ETE / esgoto bruto no Brasil,

quando comparada aos trabalhos de Silva (2012) (COC 1080 ng L⁻¹), Da Silva et al. (2018) (COC 1175 ng L⁻¹) e Sodré et al. (2022) (COC 712-943 ng L⁻¹) (Quadro 3).

Para BE, foi observada em média uma concentra o (763,23 ng L⁻¹) 46 vezes maior que a relatada por Van Nuijs et al. (2009) na Bélgica e 490 vezes maior que a observada por Mastroianni et al. (2016) na Espanha, ambos em águas superficiais (Quadro 2). BE também foi investigada em águas superficiais no Reino Unido (123 ng L⁻¹), EUA (6,4-134 ng L⁻¹), Hungria (1,2-43,9 ng L⁻¹) e Eslov nia (6-9,6 ng L⁻¹), indicando concentra es abaixo das observadas no presente estudo (ASIMAKOPOULOS et al., 2017; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008; KONDOR et al., 2020; VEROVŐEK et al., 2023; WATANABE et al., 2020)

No comparativo com estudos no Brasil, a concentra o média de BE observada neste estudo foi 449 vezes maior que a relatada em águas superficiais por Shihomatsu et al. (2017). As concentra es de BE detectadas em galeria urbana de desag e no mar em São Paulo também demonstraram níveis (4,8-278 ng L⁻¹) abaixo do observado no presente estudo (ROVERI et al., 2020, 2021) (Quadro 3). No entanto, a média de BE 763,23 ng L⁻¹ observada neste estudo foi menor que os 1019 ng L⁻¹ detectados por Campestrini e Jardim (2017) em São Paulo (Quadro 3). A maior concentra o de BE detectada no presente estudo (2004,39 ng L⁻¹), demonstrou-se maior que a relatada em estudos nos EUA (ASIMAKOPOULOS et al., 2017; FOPPE; HAMMOND-WEINBERGER; SUBEDI, 2018), Turquia (DAGLIOGLU; GUZEL; KILERCIOGLU, 2019) e Pol nia (SULEJ-SUCHOMSKA et al., 2020), os quais detectaram 1070, 1200, 99 e 29 ng L⁻¹ de BE em esgoto bruto/afluente de ETE, respectivamente (Quadro 2). Já na compara o com trabalhos realizados no Brasil, os níveis de BE detectados neste estudo não superaram os observados nos estudos de Sodré et al. (2018) (BE 4297 ng L⁻¹), Da Silva et al. (2018) (BE 8559 ng L⁻¹) e Sodré et al. (2022) (BE-final de semana 2238 ng L⁻¹ e BE-carnaval 3680 ng L⁻¹) para esgoto bruto / afluente de ETE (Quadro 3). Os maiores níveis de BE (1812 ng L⁻¹) observados em monitoramento de afluente de ETE de segunda   quinta-feira após semana de carnaval por Sodré et al. (2022) mantiveram-se, entretanto, abaixo dos 2004,39 ng L⁻¹ relatados neste estudo.

A esta o chuvosa apresentou maiores níveis médios de COC (383,68 ng L⁻¹) e BE (1022,16 ng L⁻¹) comparados aos observados na esta o seca (192,27 e 504,30 ng L⁻¹, respectivamente) (Tabela 2), com medianas de 149,03 e 289,32 ng L⁻¹ para COC e 353,03 e 920,19 ng L⁻¹ para BE, respectivamente (ANEXO II). Simultaneamente, os resultados de N-NH₃ e DQO apresentaram menores níveis médios na esta o chuvosa (N-NH₃ 17,09 e DQO 177,86 mg L⁻¹) (medianas N-NH₃ 12,60 e DQO 115,59 mg L⁻¹) comparados   esta o seca (N-NH₃ 19,68 e DQO 180,15 mg L⁻¹) (medianas N-NH₃ 17,23 e DQO 116,62 mg L⁻¹) (Tabela 1 e

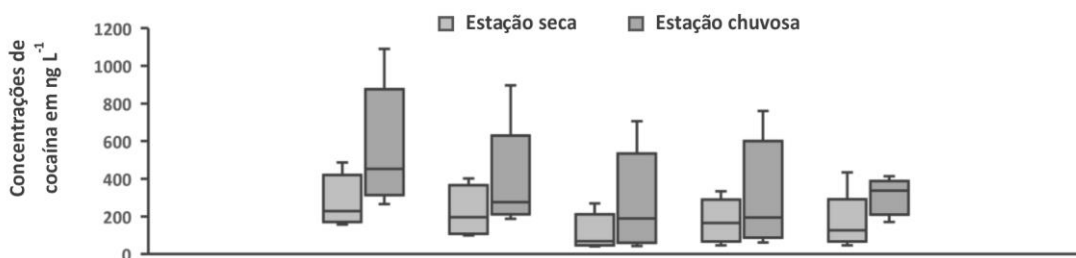
ANEXO II). Os menores níveis de N-NH₃ e DQO na estação chuvosa indicam uma diluição dos níveis esgoto nos rios urbanos investigados. Mesmo considerando-se que nas sub-bacias dos rios Irajá e Meriti foram observados maiores índices pluviométricos médios na estação seca (Tabela 1), estes rios, assim como o observado em todos os demais rios monitorados, indicaram maiores concentrações médias de COC e BE na estação chuvosa (Figura 14 e Anexo III). Esse fato sugere, portanto, que os níveis de COC e BE monitorados estariam associados em maior proporção com hábitos de consumo de COC relacionados a seu uso recreativo do que necessariamente com um aumento da carga de esgotos, observando-se maiores concentrações ambientais durante primavera e verão (estação chuvosa), semelhante ao relatado por Fontes et al. (2019).

Figura 14: Concentrações COC e BE monitoradas, durante estações seca e chuvosa.

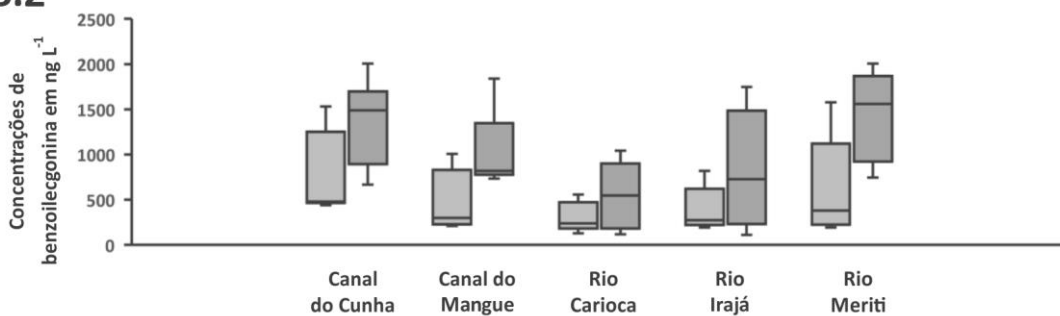
A = Concentrações máxima, média, mínima e global de cocaína e benzoilecgonina nos pontos de coleta; B.1 e B.2 = Variação das concentrações de cocaína e benzoilecgonina em água de rio, respectivamente; N = 3 replicatas.

A.	COC (ng L ⁻¹)			BE (ng L ⁻¹)			COC/BE		
	Estação	Estação	média	Estação	Estação	média	Estação	Estação	
	seca	chuvosa		seca	chuvosa		seca	chuvosa	
Canal do Cunha	Máx.	487,54	1089,96	1531,05	1708,79		0,32	0,64	
	Méd.	276,41	640,93	458,67	739,15	1260,49	999,82	0,37	0,51
	Mín.	156,66	265,33		440,06	665,78		0,36	0,40
Canal do Mangue	Máx.	401,04	896,85		1008,27	1838,19		0,40	0,49
	Méd.	222,71	390,88	306,79	456,35	1017,85	737,10	0,49	0,38
	Mín.	98,94	188,18		210,06	732,87		0,47	0,26
Rio Carioca	Máx.	269,23	705,87		556,40	1042,38		0,48	0,68
	Méd.	110,70	273,44	192,07	295,12	554,56	424,84	0,38	0,49
	Mín.	41,85	43,43		128,29	117,01		0,33	0,37
Rio Irajá	Máx.	334,22	760,38		819,12	1748,90		0,41	0,43
	Méd.	175,58	302,49	239,04	380,75	831,02	605,88	0,46	0,36
	Mín.	47,21	61,84		191,56	111,34		0,25	0,56
Rio Meriti	Máx.	434,29	413,58		1576,51	2004,39		0,28	0,21
	Méd.	175,94	310,64	243,29	650,14	1446,86	1048,50	0,27	0,21
	Mín.	61,48	170,88		274,82	745,82		0,22	0,23

B.1



B.2



Fontes et al. (2019) investigaram o comportamento dos níveis de COC e BE durante 1 ano na bacia de Santos, no estado de São Paulo / Brasil, resultando em maiores níveis de COC detectados no final do verão, em contraste com a esperada diminuição da concentração de COC quando beneficiada a hidrólise à BE pelo aumento da temperatura (FONTES et al., 2019). Fontes et al. (2019) concluíram que o aumento nas concentrações de COC retrata seu uso recreativo na área investigada, aumentando a detecção ambiental conforme aumento da população pela chegada de turistas (FONTES et al., 2019). A detecção ambiental de drogas de abuso associada ao consumo recreativo também foi relatada por Kim et al. (2017), observando aumento nos níveis de metanfetamina em afluente de ETE localizada em região turística. Segundo os autores, o aumento de COC foi identificado para o pico da temporada de férias em comparação com as épocas pré e após temporada de férias na região turística (KIM et al., 2017). Kim et al. (2017) não observaram mesmo comportamento em ETEs investigadas nas regiões semirural e residencial da Coreia do Sul.

O padrão de consumo recreativo de COC também é identificado na literatura em estudos de monitoramento ambiental pela diferenciação entre dias de semana e finais de semana. O monitoramento diário dos níveis de COC em ETE durante 1 semana resultou em picos de consumo aos domingos no DF / Brasil (DA SILVA et al., 2018). Os mesmos autores também relataram picos de consumo de COC associados ao feriado de Carnaval no DF / Brasil (DA SILVA et al., 2018). Em outro estudo, COC e BE foram monitorados em afluente de ETE no DF, observando-se uma diminuição nas concentrações detectadas na semana após a associada ao feriado de carnaval (SODRÉ et al., 2022). Em relação ao comportamento dos níveis de COC em eventos, Foppe, Hammond-Weinberger e Subedi (2018) realizaram um estudo baseado em epidemiologia de esgoto com afluente de ETE, constatando aumento no consumo de anfetamina, metanfetamina, cocaína, morfina e metadona no feriado de Dia da Independência, em comparação com dias comuns nos EUA (FOPPE; HAMMOND-WEINBERGER; SUBEDI, 2018). Por sua vez, a relação entre consumo de COC e dias associados à diferentes gêneros musicais em um festival de música com público de mais de 130 mil pessoas foi investigada por Mackulák et al. (2019a) na República Tcheca e Eslovaca, utilizando abordagem de epidemiologia do esgoto em seis ETEs. Os autores identificaram maiores níveis de COC e ecstasy nas amostras associadas aos dias dos ritmos pop/rock e dance do festival, em comparação com demais dias (MACKULÁK et al., 2019a). Neste estudo, todas campanhas foram realizadas em dias de semana, em ambas as estações, contudo, as campanhas de outubro e novembro foram realizadas após as datas festivas (prolongadas) de Dia do Comércio (21/10/2022) e Dia da Proclamação da República (15/11/2022). Apesar disso, os

níveis de COC e BE monitorados nas campanhas de outubro e novembro foram significativamente menores que os observados para os demais meses da estação chuvosa (dezembro e janeiro) em cada ponto de coleta (Anexo III). Esse fato sugere que o pico da temporada de férias na cidade (dezembro e janeiro) teria maior influência sobre o consumo de COC comparado ao esperado efeito do consumo recreativo esperado para épocas de feriados prolongados.

As maiores concentrações médias de COC foram observadas no Canal do Cunha para ambas as estações (Figura 14). Já as menores concentrações médias de COC e BE para ambas as estações foram observadas no Rio Carioca (Figura 14). Destaca-se que, apesar das maiores concentrações de COC observados no Canal do Cunha, este não apresentou os maiores níveis para os parâmetros N-NH₃ e DQO (Tabela 1). Ao invés disso, o Canal do Cunha apresentou os menores níveis médios de DQO da estação chuvosa (Tabela 1), sugerindo que o comportamento de consumo de COC associado à sua sub-bacia hidrográfica seria o quesito de maior influência nos níveis de COC observados. Quanto à BE, o Rio Meriti apresentou as maiores concentrações médias em ambas as estações (Figura 14), apresentando também os maiores índices médios de N-NH₃ (Tabela 1), sugerindo a influência do aporte de esgotos associados, bem como a influência da maior temperatura relatada sobre a hidrólise de COC (associada ao pH neutro) (FONTES et al., 2019), principalmente na estação chuvosa (Tabela 1).

O Rio Carioca apresentou os menores níveis de COC e BE relatados para ambas as estações (Figura 14), enquanto apresentou os menores índices médios de N-NH₃ (Tabela 1). Ao mesmo tempo, o Rio Carioca foi também associado aos maiores índices pluviométricos registrados, concordando com as menores temperaturas registradas no momento da coleta (Tabela 1). Esses parâmetros, portanto, parecem ter contribuído em conjunto para as menores concentrações de COC e BE monitoradas.

Em todos os pontos amostrados, em ambas as estações, as concentrações de BE foram superiores às de COC (Figura 14 e Tabela 1). Esse fato condiz com a conhecida diferença entre os volumes de excreção de BE (45 %) e COC (1-9 %) ($COC/BE \approx 0,2$) (GARCÍA-CAMBERO et al., 2015), bem como as diferenças de estabilidade entre as moléculas. Em ambientes aquáticos, COC pode ser rapidamente degradada, principalmente pela hidrólise à BE, enquanto esta pode permanecer inalterada por mais de duas semanas nestes ambientes (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017). Esse fato teria sido beneficiado durante as campanhas neste estudo, uma vez que a hidrólise de COC à BE é beneficiada pelo pH 7-8 e temperatura ambiente (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017). Assim, a razão COC/BE tende a diminuir com o tempo (SODRÉ et al., 2022), com valores abaixo de 0,75 considerados característicos de COC

proveniente de consumo humano (VAN NUIJS et al., 2009b). Razões COC/BE acima de 0,75 indicariam baixa conversão de COC à BE, com aporte de COC potencialmente relacionada a fontes como descarte da droga não consumida e perdas durante manuseio / transporte (CASTIGLIONI et al., 2013; SODRÉ et al., 2018b). Neste estudo, as razões entre as médias de COC e BE variaram na faixa de 0,22-0,49 na estação seca e de 0,21-0,51 na estação chuvosa (Figura 14). Razões COC/BE de 0,27-0,71 foram observadas pela literatura relacionada ao monitoramento de COC e BE em afluentes de ETE (SODRÉ et al., 2022). Segundo os autores, esses valores corresponderiam à faixa esperada para COC relacionada ao consumo humano, entretanto, advertem que a razão COC/BE pode sofrer influência de fatores como a rota de administração e o consumo com outras substâncias (podendo influenciar as proporções de excreção), além de sofrer transformações associadas à matriz investigada (SODRÉ et al., 2022). Razões de COC/BE dentro da faixa 0,20-0,75 foram observadas em todos os rios urbanos monitorados neste estudo, em ambas as estações, excetuando-se o Canal do Mangue (1,07) e o Rio Irajá (0,79) na campanha de maio/2022 (Anexo III), indicando potencialmente o aporte de níveis de COC não consumida por usuários, descartada diretamente no ambiente.

Os resultados observados acima demonstraram as concentrações de COC e BE ao longo de 8 campanhas de amostragem em sub-bacias da Macrorregião de Drenagem da Baía de Guanabara. Deve-se observar que as maiores concentrações de COC monitoradas no Ponto Canal do Cunha não redundaram nas maiores concentrações de BE, sinalizando que diferentes dinâmicas estão associadas aos níveis dos contaminantes investigados, como o aporte de esgotos, estabilidade das moléculas, temperatura e dados pluviométricos. Entretanto, a complexidade da dinâmica dos níveis de COC e BE em rios e canais no Rio de Janeiro também precisa ser contrastada com a realidade do padrão de consumo na cidade, o qual revelou as maiores concentrações de COC principalmente associadas ao período do verão (dezembro e janeiro), quando é esperado aumento da população pela chegada de turistas. Deve-se atentar também para o fato de que os resultados observados, embora correspondentes às duas estações climáticas avaliadas, retratam uma condição de amostragem simples conforme o recorte temporal empregado, não podendo ser desconsiderado que COC e BE podem apresentar variação ao longo de dias da semana (DA SILVA et al., 2018; FOPPE; HAMMOND-WEINBERGER; SUBEDI, 2018) ou mesmo ao longo de um mesmo dia. Os níveis de COC observados em rios e canais na cidade foram por vezes superiores aos relatados para afluentes de ETEs ao redor do mundo, apontando não apenas a demanda/consumo de COC, mas também a degradação ambiental de rios urbanos cariocas, deflagrando um quadro alarmante de saúde pública.

Por sua vez, a detecção de COC e BE na frequência de 100 % das campanhas e pontos de coleta, bem como as altas concentrações monitoradas (comparáveis às esperadas em esgoto bruto), parecem concordar com o alarmante cenário brasileiro enquanto principal país consumidor de COC da América do Sul (UNODC, 2021a). Os resultados aqui apresentados sugerem que COC e BE estariam presentes constantemente nesses rios, expondo cronicamente organismos não-alvo e impactando potencialmente ambientes aquáticos.

5.2. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)

Os resultados do ensaio de toxicidade com os embriões de *zebrafish* expostos por 96 h à COC e BE, foram descritos sob a forma de *scores* conforme adaptado de Guarienti et al. (2014). Efeitos teratogênicos e morfológicos além dos preconizados pela OECD 236 (2013) foram avaliados a cada 24h (total de 96 h), demonstrando a ocorrência de malformações, baixa resposta ao toque, edemas, deformações generalizadas e casos de morte após primeiras 24h. *Scores* (s=1) foram atribuídos a cada observação de efeitos morfológicos e teratogênicos a cada dia de observação e casos de deformação generalizada receberam *score*=3 a cada dia de observação (adaptado de GUARIENTI et al., 2014). Casos de morte receberam *score* igual ao total de efeitos atribuíveis para um indivíduo até o respectivo dia de observação no teste, compreendendo-se *score*=5 para casos de morte observados nas primeiras 24 h, *score*=10 para 48 h, *score*=15 para 72 h h e *score*=20 pra casos de morte após 96 h (adaptado de GUARIENTI et al., 2014). Não foram observados casos de morte em mais de 10 % do total de embriões nos controle (meio embriônico e MeOH) (OECD, 2013), bem como não foram observados efeitos teratogênicos e de malformação em mais de 10 % dos embriões nos controles negativos à 72 h, indicando a validade dos achados (GUARIENTI et al., 2014).

As exposições à COC e BE apresentaram *scores* gerais de 58,5 e 131,5, respectivamente, considerando-se os *scores* de “efeitos + casos de morte”. Os controles de meio embriônico e MeOH apresentaram *scores* de 4,5 e 4,0 (respectivamente) para a soma dos *scores* dos diferentes efeitos morfológicos e teratogênicos avaliados. Assim, a soma dos *scores* dos efeitos observados nas exposições à COC foi superior à observada nos controles a partir da exposição à COC 1000 ng L⁻¹, enquanto para BE, o mesmo foi observado já a partir à BE 50 ng L⁻¹ (Tabela 3 e Anexo IV). Cabe ser ressaltado que a exposição à BE 50 ng L⁻¹ representa 6 % da concentração média de BE (763,23 ng L⁻¹) observada durante a fase de monitoramento

neste estudo, representando também 45 % menos BE em relação à menor concentração monitorada (Tabela 2).

Edemas / inchaços de saco vitelínico e edemas de pericárdio foram os *endpoints* mais observados nos embriões expostos à COC ao longo das 96 h de experimento, enquanto edemas de pericárdio e atraso na formação corresponderam aos mais observados nas exposições à BE (Tabelas 3 e 4). Esses efeitos, portanto, estariam associados níveis ambientais de COC e BE monitorados, os quais apontaram concentrações máximas de 1089,96 ng L⁻¹ (COC) e 2004,39 ng L⁻¹ (BE) (Tabela 2).

Tabela 3: *Scores* observados nas exposições à COC e BE.

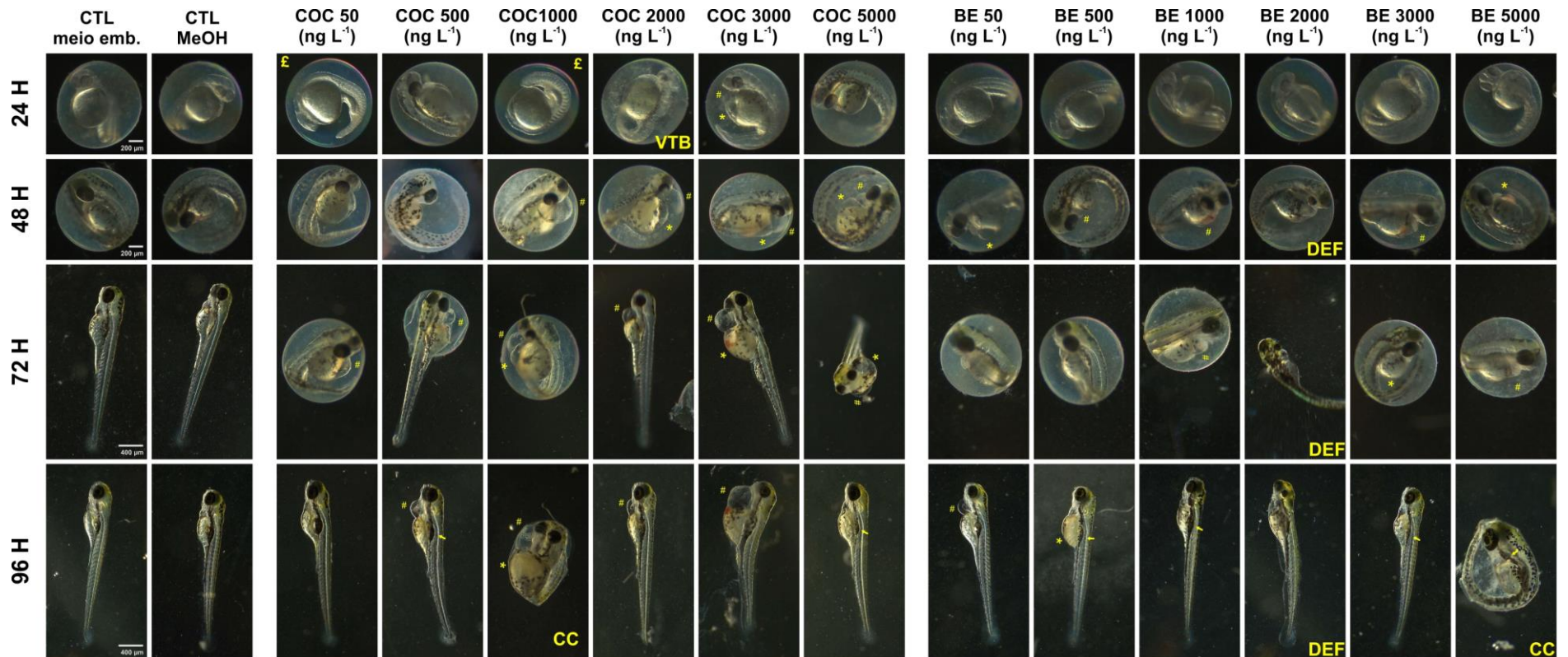
	50 (ng L ⁻¹)	500 (ng L ⁻¹)	1000 (ng L ⁻¹)	2000 (ng L ⁻¹)	3000 (ng L ⁻¹)	5000 (ng L ⁻¹)	Soma por efeito	
<i>Scores médios</i> COC	Atraso na formação	1,0	0,0	1,0	2,5	0,5	1,0	6,0
	Edema no pericárdio	1,5	1,0	2,0	6,0	1,5	3,0	15,0
	Edema / inchaço no saco vitelínico	0,5	0,5	3,5	7,5	2,5	2,5	17,0
	Malformação da cauda/vértebra	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5
	Baixa resposta ao toque	0,5	0,0	0,5	2,0	3,0	4,0	10,0
	Deformação generalizada	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Soma dos <i>scores</i> por exposição	3,5	1,5	7,0	18,5	7,5	10,5	-
<i>Scores médios</i> BE	Atraso na formação	1,0	4,0	1,5	1,5	2,0	3,5	13,5
	Edema no pericárdio	1,5	2,5	3,0	3,0	1,5	3,0	14,5
	Edema / inchaço no saco vitelínico	1,5	1,5	1,0	1,0	1,5	1,0	7,5
	Malformação da cauda/vértebra	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	1,0
	Baixa resposta ao toque	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Deformação generalizada	3,0	0,0	0,0	7,5	0,0	4,5	15,0
	Soma dos <i>scores</i> por exposição	7,0	8,0	5,5	13,5	5,0	12,5	-

Não foram observados casos de deformação generalizada para as exposições à COC, enquanto quatro casos foram observados nas exposições à BE (Tabelas 3 e 4). Malformação da cauda/vértebra correspondeu ao efeito menos observado nas exposições à COC, enquanto ausência de resposta ao toque/batimentos foi o *endpoint* menos observados nos embriões expostos à BE (Tabelas 3, 4 e Anexo IV). A Figura 15 apresenta imagens representativas dos efeitos observados nos embriões expostos às diferentes concentrações de COC e BE.

Tabela 4: Frequência (%) dos efeitos observados nos embriões expostos à COC e BE.

		50	500	1000	2000	3000	5000
		(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)
Frequências COC	Atraso na formação	5,0%	0,0%	5,0%	12,5%	2,5%	5,0%
	Edema no pericárdio	7,5%	5,0%	10,0%	30,0%	7,5%	15,0%
	Edema/inchaço no saco vitelínico	2,5%	2,5%	17,5%	37,5%	12,5%	12,5%
	Malformação da cauda/vértebra	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	0,0%	0,0%
	Baixa resposta ao toque	2,5%	0,0%	2,5%	10,0%	15,0%	20,0%
	Deformação generalizada	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Frequências BE	Atraso na formação	5,0%	20,0%	7,5%	7,5%	10,0%	17,5%
	Edema no pericárdio	7,5%	12,5%	15,0%	15,0%	7,5%	15,0%
	Edema/inchaço no saco vitelínico	7,5%	7,5%	5,0%	5,0%	7,5%	5,0%
	Malformação da cauda/vértebra	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	0,0%	2,5%
	Baixa resposta ao toque	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Deformação generalizada	5,0%	0,0%	0,0%	12,5%	0,0%	7,5%

Figura 15: Efeitos observados nos embriões expostos às concentrações de COC e BE. Edemas de pericárdio foram indicados por um #, edemas e inchações no saco vitelínico são indicados por *, casos de atraso na formação da bexiga natatória foram indicados por →, atrasos pelo não desprendimento do córion foram representados por CC, outros atrasos na etapa de formação foram indicados com £, VTB foi atribuído à malformação da cauda/vértebra e DEF foi atribuído à casos de deformação generalizada (observação de três ou mais efeitos).



Quatro casos de morte foram observados nas exposições à COC, correspondendo à 1 caso para COC-50, 1 para COC-500 e 2 para COC 1000 ng L⁻¹, todos nas primeiras 24 h de experimento, sob a forma de coágulos (Tabela 5 e Anexo IV). Entretanto, 22 mortes foram observadas nas exposições à BE, 450 % mais casos que os observados para COC, correspondendo à 18 casos nas primeiras 24 h (BE 50 à BE 5000 ng L⁻¹) sob a forma de coágulos, 1 após 48 h (BE 2000 ng L⁻¹) e 3 após 96 h (BE 1000, BE 3000 e BE 5000 ng L⁻¹). De modo semelhante, Parolini et al. (2018) observaram casos de morte apenas nas primeiras 24 h em embriões de *zebrafish* expostos à 0,3 e 1,0 mg L⁻¹ de COC e BE, denotando uma maior susceptibilidade nos primeiros estágios de vida do embrião. Neste estudo, essa maior susceptibilidade nas primeiras 24 h de ensaio foi notada principalmente pela toxicidade associada à BE.

Tabela 5: Casos de morte observados nas exposições à COC e BE.

	Cocaína		Benzoilecgonina	
	Antes de 24h	Após 24h	Antes de 24h	Após 24h
50 ng/L	1	0	7	0
500 ng/L	1	0	2	0
1000 ng/L	2	0	1	1
2000 ng/L	0	0	4	1
3000 ng/L	0	0	2	1
5000 ng/L	0	0	2	1

A exposição à BE acarretou maiores efeitos nos embriões, demonstrados pelo maior *score* geral (131,5 – BE) em relação à exposição com COC (58,5 – COC), pelos *scores* de efeitos morfológicos e teratogênicos acima dos observados no controle a partir da primeira concentração de BE (BE-50 ng L⁻¹), pelo maior número de coágulos nas primeiras 24 h de formação (quando os embriões estariam mais sensíveis) e pela ocorrência de casos de deformações generalizadas (observação de três ou mais efeitos em um indivíduo) e casos de morte após 24 h. A maior toxicidade associada à BE em relação à COC foi observada por Parolini *et al.* (2017), relatando efeitos citotóxicos em embriões de *zebrafish* a partir da exposição à BE 110 ng L⁻¹, enquanto o mesmo teria sido observado para COC a partir de 4 nmol L⁻¹ (PAROLINI *et al.*, 2017). A formação de micronúcleos foi verificada como resultado à exposição de embriões de *zebrafish* à BE (BE 110 e 1150 ng L⁻¹), porém não foram observadas alterações significativas quando expostos à COC (PAROLINI *et al.*, 2017). Parolini *et al.* (2017) também avaliaram biomarcadores de estresse oxidativo nos embriões expostos à COC e BE,

possibilitando calcular um índice de resposta de efeito tóxico, o qual indicou um maior índice associado à BE em relação à COC (PAROLINI *et al.*, 2017). Parolini *et al.* (2018) investigaram efeitos proteômicos decorrentes da exposição de embriões de *zebrafish* à COC e BE (0.3 e 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$), observando que BE teria acarretado mais efeitos tóxicos que sua molécula parental (COC), considerando-se a maior quantidade de proteínas alteradas em comparação à COC nas duas concentrações utilizadas (0.3 e 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) (PAROLINI *et al.*, 2018a). Apesar disso, García-Camero *et al.* (2015) não observaram alterações de viabilidade celular em embriões expostos à BE (BE - 0,01-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$), argumentando sobre a hipótese de baixa toxicidade de BE e ação protetora do córion (GARCÍA-CAMBERO *et al.*, 2015).

Não foram encontrados trabalhos indexados na literatura sobre os efeitos de COC e BE em embriões de *zebrafish* utilizando o FET TEST, porém dados sobre alterações proteômicas e genéticas nesses embriões podem contribuir com a elucidação dos achados do presente estudo. A exposição de embriões de *zebrafish* à COC e BE (0.3 e 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) modulou significativamente níveis de proteínas nos embriões, demonstrando que 53 das 113 proteínas isoladas indicaram alterações em transporte de lipídios, estrutura ocular, metabolismo lipídico e energético, resposta ao estresse oxidativo e estrutura citoesquelética (PAROLINI *et al.*, 2018a). Embriões de *zebrafish* expostos à COC (455 $\mu\text{g L}^{-1}$) demonstraram alterações na expressão de SP mRNA nas primeiras h da embriogênese (24 hpf) no sistema nervoso central e medula espinhal, sugerindo uma relação do neurotransmissor SP com o processo de indução de proliferação celular (LÓPEZ-BELLIDO; BARRETO-VALER; RODRÍGUEZ, 2013a). Neste estudo, alterações morfológicas de cauda/vértebra foram identificadas em ambas as exposições (COC e BE), observando-se em embrião exposto à COC (COC-2000 ng L^{-1}) e em embriões expostos à BE (BE-2000 e 5000 ng L^{-1}). Apesar disso, Mersereau *et al.* (2016) não identificaram efeitos morfológicos sobre tamanho corporal, tamanho dos olhos, área de diencéfalo e cérebro traseiro em embriões expostos (após 5 dpf) à COC (2,5, 5, 10 e 20 mg L^{-1}). Esses autores, contudo, observaram diminuições da área telencefálica em doses mais altas de COC (10 e 20 mg L^{-1}), postulando que este efeito estaria relacionado ao tempo de incubação, indicando a penetração de COC no córion dos embriões (MERSEREAU *et al.*, 2016). A penetração de COC no córion postulada por Mersereau *et al.* (2016) estaria em acordo com os achados deste estudo, uma vez que foram observados efeitos já nas primeiras 24 h de ensaio.

Modulações de proteínas envolvidas no metabolismo energético (creatina quinase) na exposição à BE (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) teriam alterado a regulação da homeostase e transferência de energia fundamentais em tecidos como cérebro, fígado e coração nos primeiros estágios de desenvolvimento na embriogênese (PAROLINI *et al.*, 2018a). Mersereau *et al.* (2016; 2015)

expuseram embriões de *zebrafish* à COC (2,5, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹), observando efeitos da exposição sobre o coração dos peixes. Segundo os autores, foram identificados aumentos na frequência cardíaca resultando em um efeito dose-resposta em formato de sinoidal, com bradicardia verificada na maior concentração de COC (20 mg L⁻¹) em relação às exposições menos concentradas, em ambos os estudos. Em relação à efeitos sobre o coração observados neste estudo, o *endpoint* edema de pericárdio foi o mais proeminente nas exposições à BE e o segundo nas exposições à COC, corroborando com as esperadas alterações sobre o referido órgão.

COC e BE foram capazes de provocar alterações morfológicas e teratogênicas nos embriões expostos por 96 h, mesmo em concentrações ambientais semelhantes às observadas na fase de monitoramento deste estudo. BE demonstrou maiores efeitos tóxicos comparados à COC, em concordância com a literatura relacionada (PAROLINI et al., 2017, 2018a). Além disso, efeitos da exposição à BE maiores que no controle (soma de *scores*) foram observados já na primeira concentração testada (50 ng L⁻¹), a qual representou menos de 50 % da menor concentração de BE monitorada em rios urbanos neste estudo (Tabela 2). Com isso, assevera-se a preocupação quanto aos efeitos ambientais dos contaminantes investigados, sobretudo BE, uma vez que também correspondeu às maiores concentrações monitoradas em rios urbanos neste trabalho. Uma vez no ambiente, BE apresenta-se mais estável que COC (CAMPESTRINI; JARDIM, 2017), podendo determinar períodos mais longos de exposição nesses rios, agravando riscos relacionados à ecologia de sistemas aquáticos e à organismos não-alvo.

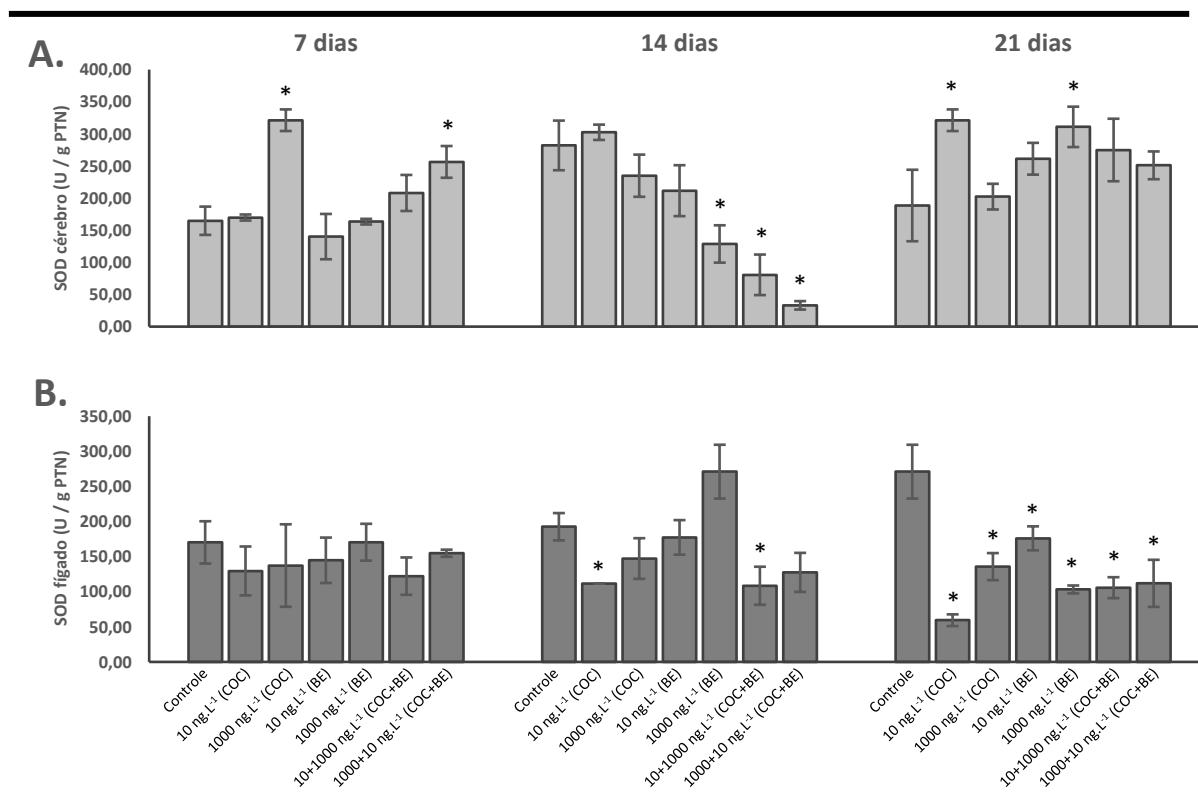
5.3. ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM ZEBRAFISH ADULTOS (*Danio rerio*)

Peixes *zebrafish* adultos foram submetidos a exposições unitárias e combinadas de COC e BE por 21 dias, conforme concentrações ambientais (Quadro 9) e sistema semi-estático (visando renovação das concentrações testadas). Biomarcadores de estresse oxidativo foram analisados a cada semana de experimento nos peixes, totalizando 3 aberturas de aquário por concentração investigada. Cada abertura resultou na separação de 12 cérebros e 12 fígados por exposição, proporcionando a análise de três pools de cada órgão por concentração. Níveis de proteínas totais associados a cada exposição foram utilizados como fator de normalização das análises. Os resultados dos biomarcadores superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), tióis totais (TOT), glutathione-S-transferase (GST), malondialdeído (peroxidação lipídica) (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) são apresentados a seguir.

5.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática de SOD foi analisada nas amostras de cérebro e fígado dos peixes, a partir do método colorimétrico do Superoxide Dismutase Assay Kit Assay (Cayman Chemical Company, EUA) (Figura 16).

Figura 16: Atividade de SOD em cérebro e fígado de peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão da atividade da enzima superóxido dismutase. A = resultados no órgão cérebro; B = resultados no órgão fígado. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



A exposição a drogas psicoativas em concentrações ambientais pode acarretar efeitos oxidativos em *zebrafish* associados à geração de espécies reativas de oxigênio (ARAÚJO et al., 2022; GOMES et al., 2019). Notadamente, COC e seus metabólitos são conhecidamente capazes de acarretar efeitos oxidativos em *zebrafish* expostos (PAROLINI et al., 2017). A enzima SOD atua na defesa antioxidante do organismo quando em situações de estresse, acelerando a reação de dismutação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Neste estudo, alterações significativas na atividade de SOD em relação aos controles foram observadas nos peixes expostos.

No cérebro, foram observados aumentos de atividade de SOD após a primeira semana de ensaio, associados à exposição à COC 1000 ng L⁻¹, não sendo observadas alterações relacionadas à BE, exceto na combinação COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹ (Figura 16). Após 14 dias de ensaio, foi observada uma tendência de diminuição de atividade em todas as exposições a partir de COC 1000 ng L⁻¹, enquanto após 21 dias, foi observada uma tendência de aumento de atividade em todas as exposições, com aumentos significativos associados à COC 10 e BE 1000 ng L⁻¹ (Figura 16). Para fígado, não foram observadas alterações significativas na atividade de SOD após primeira semana de ensaio, enquanto menores atividades foram registradas na maioria das exposições após 14 dias, com diminuições significativas para COC 10 e COC 10 + BE 1000 ng L⁻¹. BE 1000 ng L⁻¹ foi a única exposição relacionada a aumento de atividade de SOD na segunda semana de experimento. Após 21 dias, foram observadas diminuições de atividade significativas para todas as exposições (Figura 16).

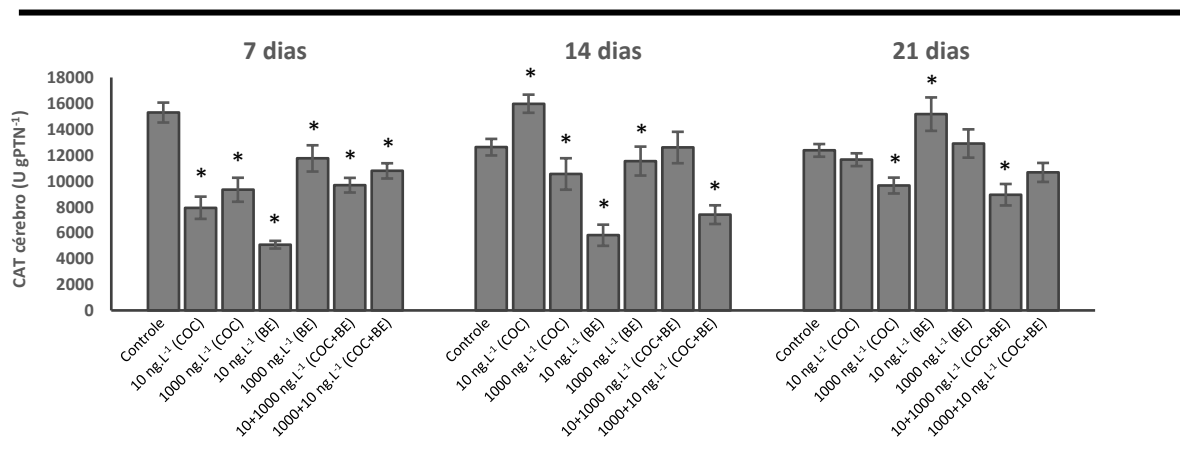
Não há muitas investigações na literatura sobre os efeitos oxidativos de COC e BE em *zebrafish*, bem como não há na literatura estudos que investigam efeitos combinados destes contaminantes sobre o modelo. Assim, destaca-se o estudo de Parolini et al. (2017) como o que realizou esta avaliação. Embriões de *zebrafish* foram expostos por 96 h à 0,012, 0,12, 1,21 e 12,13 µg L⁻¹ de COC e 0,011, 0,11, 1,15 e 11,57 µg L⁻¹ de BE, correspondendo à 0,04, 0,4, 4 e 40 nmol L⁻¹ de cada contaminante, respectivamente (PAROLINI et al., 2017). Os embriões expostos apresentaram aumentos significativos na atividade de SOD para ambos os contaminantes (COC e BE) nas exposições à 4 e 40 nmol L⁻¹, assim como aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em todas as exposições para ambos os contaminantes (significâncias observadas em COC 0,4 e 4 nmol L⁻¹ e BE 0,4-40 nmol L⁻¹) (PAROLINI et al., 2017). Os aumentos nos níveis de EROs indicaram que COC e BE teriam acionado a resposta do sistema antioxidante dos peixes e os aumentos de atividade de SOD indicaram uma superprodução de radicais superóxido, bem como sua redução à peróxido de hidrogênio (PAROLINI et al., 2017). Segundo os autores, o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio pela atuação de SOD, foi confirmado pelos aumentos de atividade da enzima GPx (glutathione peroxidase), uma vez que esta desempenha um papel importante na degradação desta espécie reativa (PAROLINI et al., 2017). Neste estudo, aumentos de atividade de SOD foram observados apenas no cérebro dos peixes, tanto em exposições à COC, quanto BE. Esses aumentos estariam associados à resposta do organismo frente à radicais superóxido produzidos a partir da exposição. Esse fato poderia estar associado à atuação de COC e BE no cérebro enquanto órgão alvo desses contaminantes. A resposta da atividade de SOD no organismo aos radicais superóxido gerados nos primeiros dias 7 de ensaio estaria associada principalmente à

exposição aos níveis de COC 1000 ng L⁻¹ nos tratamentos unitários e combinados, enquanto uma resposta a estes radicais em relação à BE foi observada apenas após 21 dias de ensaio. Apesar das induções da atividade de SOD observadas nas exposições unitárias, não foram observados nas exposições combinadas aumentos de atividade superiores às exposições unitárias, sugerindo uma interação negativa entre os contaminantes (Figura 16).

5.3.2. Catalase (CAT)

A atividade enzimática de CAT foi analisada nas amostras de fígado dos peixes, a partir de método colorimétrico definido por Aebi (1984). Segundo a literatura relacionada à CAT em *zebrafish*, este biomarcador apresenta baixa atividade em cérebro de *Danio rerio* (ARAÚJO et al., 2022; GOMES et al., 2019), dessa forma, os efeitos da exposição à COC e BE foram investigados no fígado dos peixes analisados (Figura 17).

Figura 17: Atividade de CAT em fígado de peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão da atividade da enzima catalase no fígado dos peixes expostos. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



A enzima CAT atua na defesa do organismo pela decomposição da espécie oxidativa H₂O₂ em O₂ e H₂O, relacionando-se dessa forma com a atividade da enzima SOD, uma vez que esta apresenta H₂O₂ como produto de sua reação de dismutação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; YAN et al., 2015). CAT pode também atuar na oxidação (com consumo de peróxido) de compostos halogenados como fenóis, metanol e etanol (AEBI, 1984). A exposição à COC e BE neste estudo resultou em alterações significativas na atividade de CAT.

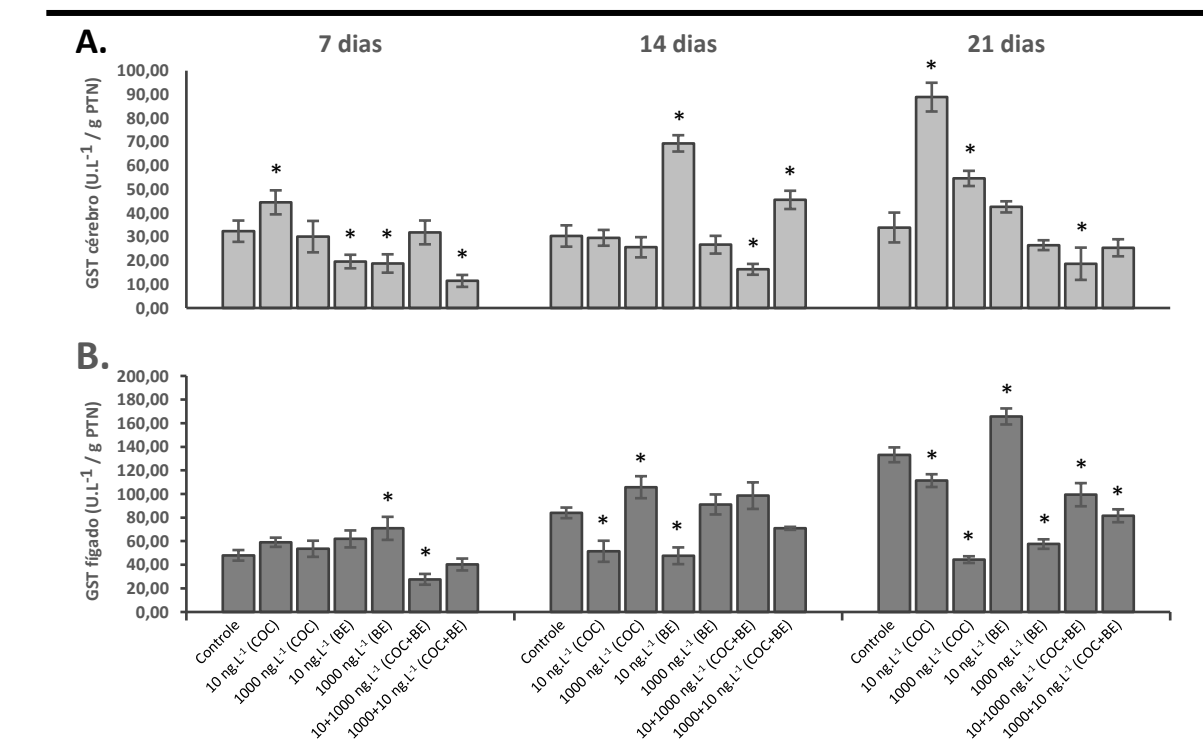
A atividade de CAT não foi induzida no fígado dos peixes após 7 dias de ensaio. Aumentos significativos foram observados apenas em dois momentos, nas exposições unitárias

à COC 10 ng L⁻¹ (após 14 dias) e à BE 10 ng L⁻¹ (após 21 dias) (Figura 17). Parolini et al. (2017) apresentaram o único estudo que avaliou a atividade de CAT em *zebrafish* expostos à COC e BE. A exposição de embriões de *zebrafish* por 96 h à COC (0,04-40 nmol L⁻¹) não resultou em alterações significativas na atividade de CAT, sendo observada apenas na exposição à BE 0,4 nmol L⁻¹ (PAROLINI et al., 2017). Os autores postularam que, apesar do aumento nos níveis de EROs relatado, juntamente com o aumento de atividade de SOD, foi observada uma baixa resposta na atividade de CAT, sugerindo que a espécies reativas H₂O₂ decorrentes da atividade de SOD estariam sendo combatidos principalmente pela atividade de GPx (PAROLINI et al., 2017). Os autores justificaram ainda, que a enzima CAT pode ter competido com GPx pelo mesmo substrato e/ou estaria sendo observada a característica de ativação de CAT quando estimulada por altas concentrações de H₂O₂ (PAROLINI et al., 2017). Neste estudo, a baixa atividade de CAT observada no fígado dos peixes seria justificada pela baixa atividade de SOD no fígado, relatada acima (Figuras 16 e 17). Além disso, as exposições combinadas de COC e BE não resultaram em aumentos significativos, mesmo após 14 e 21 dias de ensaio, quando foram observados aumentos de atividade em exposições unitárias, sugerindo uma interação de atenuação entre os contaminantes, acarretando menores efeitos que a exposição unitária (Figura 17).

5.3.3. Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade de GST no cérebro e fígado dos peixes expostos foi analisada a partir do protocolo de Habig, Pabst e Jakoby (1974) (Figura 18). A enzima GST atua na defesa do organismo acelerando o processo de conjugação de GSH com compostos tóxicos, tornando-os mais hidrofílicos e, assim, facilitando sua excreção (metabolismo de excreção de fase II) (ARAÚJO et al., 2022; YAN et al., 2015). Neste estudo, a exposição à COC e BE foi capaz de induzir a atividade de GST no cérebro dos peixes, principalmente após a segunda semana de ensaio, pelos aumentos significativos observados as exposições à BE 10 ng L⁻¹ e COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹ após 14 dias, bem como à todas as exposições unitárias à COC após 21 dias de ensaio (Figura 18). No fígado, apenas a exposição unitária à BE resultou em induções significativas da atividade de GST, observadas em todas as semanas de ensaio (Figura 18).

Figura 18: Atividade de GST no cérebro e fígado dos peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão da atividade da enzima glutaiona-S-transferase. A = resultados no órgão cérebro; B = resultados no órgão fígado. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



A exposição à 0,012, 0,12, 1,21 e 12,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ de COC não resultou em alterações significativas na atividade de GST em embriões de *zebrafish* expostos por 96 h, enquanto 0,11 e 11,57 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BE foram capazes de induzir a atividade de GST nestes organismos (PAROLINI et al., 2017). Os autores postularam que a atividade de GST observada nas exposições à BE sugerem o envolvimento desta enzima no mecanismo de detoxificação de fase II do referido metabólito de COC (PAROLINI et al., 2017).

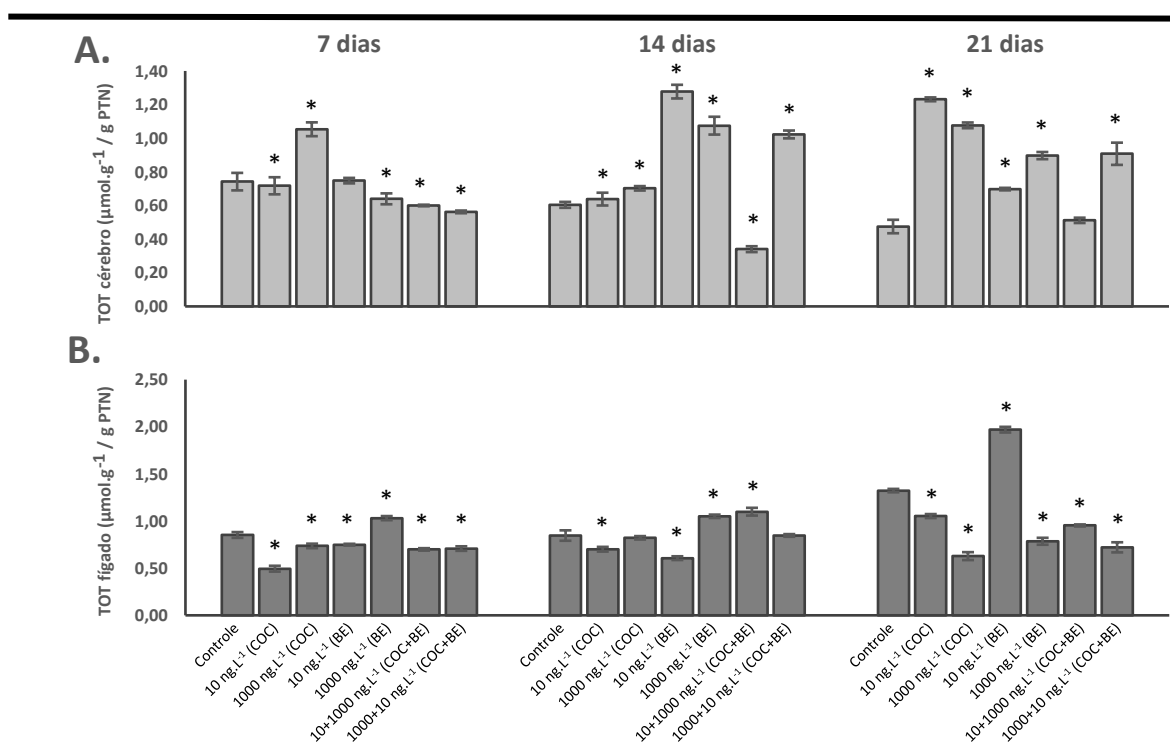
Neste estudo, GST parece ter sido ativada no cérebro principalmente nas exposições à COC na primeira e na terceira semana de ensaio, sendo observados aumentos de atividade relacionados à BE somente na segunda semana (Figura 18). Em contrapartida, as exposições unitárias à BE parecem ter sido mais proeminentes para o biomarcador GST no órgão fígado (BE 10 e 1000 ng L^{-1}), com aumentos de atividade observados na primeira e terceira semana de ensaio (Figura 18). Isso sugere que a eliminação de COC via metabolismo de excreção de fase II estaria principalmente associado ao órgão cérebro dos peixes, correspondendo a seu órgão alvo de atuação, enquanto a eliminação de BE via GST estaria principalmente associada ao fígado dos peixes. Das exposições combinadas, apenas a exposição

à COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹ resultou em indução da atividade de GST no cérebro, possivelmente associado aos maiores níveis de COC relacionados. Contudo, não foram observados aumentos significativos nas demais exposições combinadas em ambos os órgãos, não podendo ser descartada uma possível interação negativa entre os contaminantes.

5.3.4. Tióis Totais (TOT)

Os níveis de TOT foram analisados nas amostras de cérebro e fígado dos peixes, a partir do protocolo de Wilhelm Filho et al. (2005) (Figura 19).

Figura 19: Níveis de TOT em cérebro e fígado de peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão dos níveis de tióis totais. A = resultados no órgão cérebro; B = resultados no órgão fígado. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



Tióis totais atuam na defesa antioxidante do organismo pela ação de moléculas com grupamento sulfidril (-SH) (CREMLYN, 1996). O tripeptídeo glutatona reduzida (GSH) é considerado o tiól intracelular mais abundante, representando as maiores variações observadas em TOT (ARAÚJO et al., 2022). GSH pode atuar em conjunto com a enzima GST na defesa do organismo, tornando substâncias tóxicas mais hidrossolúveis, beneficiando sua eliminação do organismo (YAN et al., 2015). Além disso, GSH pode atuar como doador de elétrons enquanto co-substrato de GPx na decomposição de H₂O₂, pelo ciclo redox de glutatona,

podendo ser regenerada pela ação da enzima glutathione reductase (SALES JUNIOR et al., 2021; SIES; MOSS, 1978).

Aumentos significativos no cérebro dos peixes expostos foram observados na exposição à COC 1000 ng L⁻¹ após 7 dias e na maioria das exposições unitárias e combinadas a partir de 14 dias de ensaio, excetuando-se a exposição à combinação COC 10 + BE 1000 ng L⁻¹ para 14 e 21 dias (Figura 19). No fígado, somente a exposição à BE 1000 ng L⁻¹ induziu o aumento de TOT após 7 dias. BE 1000 ng L⁻¹ e a combinação COC 10 + BE 1000 ng L⁻¹ foram as únicas exposições que indicaram resposta no aumento de TOT após 14 dias, ao passo que a exposição à BE 10 ng L⁻¹ foi a única que resultou em aumentos significativos após 21 dias de ensaio (Figura 19).

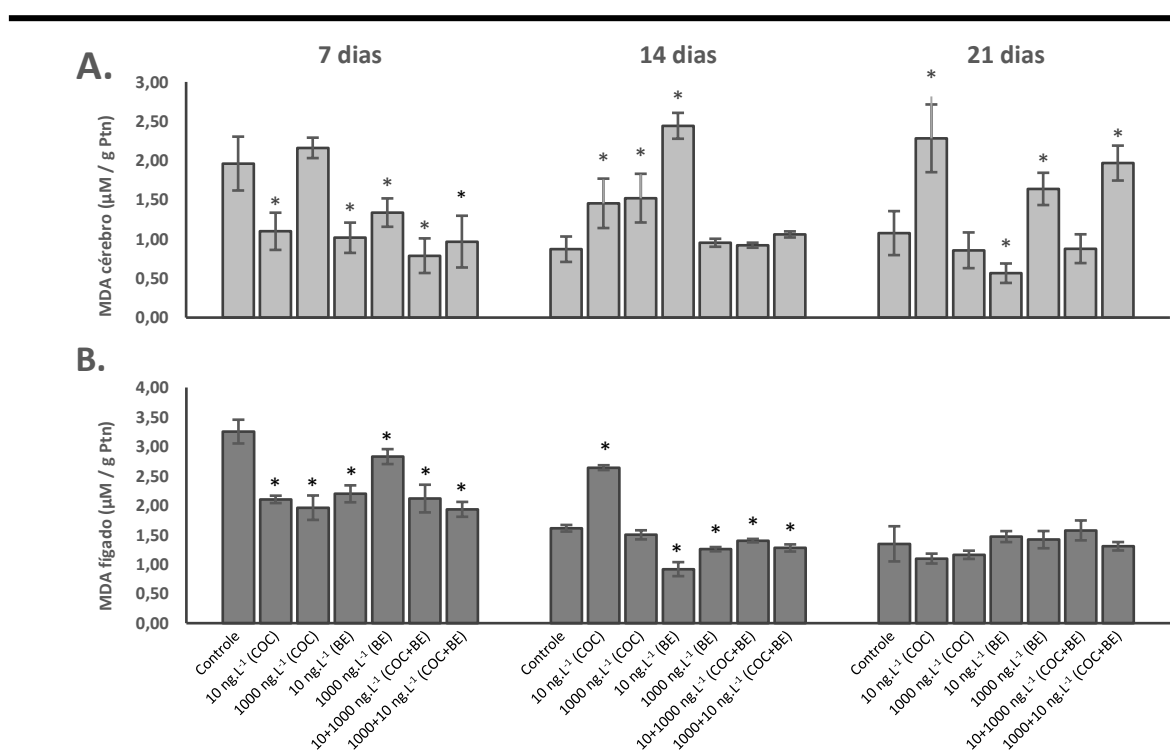
Não há na literatura trabalhos que avaliem níveis de TOT ou GSH em peixes *zebrafish* (ou outros organismos aquáticos) expostos à COC e BE. A exposição à droga psicotrópica carbamazepina (25 µg L⁻¹) resultou em aumentos significativos nos níveis de TOT no cérebro, porém não no fígado de *zebrafish* adultos expostos por 96 h (ARAUJO et al., 2022). Contudo, a exposição unitária (75 µg L⁻¹) e combinada (75+75 µg L⁻¹) aos psicotrópicos carbamazepina e clonazepam não resultou em alterações significativas no cérebro e no fígado dos peixes, excetuando-se a exposição unitária à clonazepam para cérebro, onde foi observada diminuição significativa nos níveis de GSH (GOMES et al., 2019). Peixes (*Oncorhynchus mykiss*) expostos à 0,2 mg L⁻¹ de carbamazepina por 42 dias demonstraram redução significativa nos níveis de GSH no cérebro. A escassez de estudos, bem como a variabilidade dos achados de drogas de atuação no cérebro relatados, indica a necessidade de mais investigações sobre o comportamento de TOT em organismos aquáticos expostos à COC e BE.

Neste estudo, os níveis de TOT não parecem ter acompanhado a atividade de GST para a maioria das exposições no cérebro dos peixes, sugerindo uma atuação de GSH principalmente relacionada à decomposição de H₂O₂ (Figuras 18, 19 e sessão 5.3.8). Por sua vez, os aumentos de TOT observados no fígado parecem ser acompanhados pelas induções de atividade de GST neste órgão ao longo do ensaio, sugerindo a atuação de GSH em conjunto com esta enzima (GST) (Figuras 18, 19 e sessão 5.3.8). Assim como observado para os demais biomarcadores, os aumentos de TOT no fígado foram associados principalmente a exposições à BE, enquanto no cérebro foram verificados aumentos nas exposições a ambos os contaminantes (Figura 19). As exposições combinadas, assim como visto nas seções anteriores, não resultaram em efeitos acima do observado para as exposições unitárias, sugerido uma interação de atenuação de efeitos entre COC e BE (Figura 19).

5.3.5. Peroxidação lipídica - Biomarcador Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram analisados nas amostras de cérebro e fígado dos peixes, conforme adaptação do protocolo do Kit TBARS Assay, fornecido por Cayman Chemical Company (Michigan, EUA) (Figura 20).

Figura 20: Níveis de MDA em cérebro e fígado dos peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão dos níveis de malondialdeído. A = resultados no órgão cérebro; B = resultados no órgão fígado. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



MDA é considerado um dos principais produtos da peroxidação lipídica (LPO), bem como o principal biomarcador de dano celular associado ao estresse oxidativo (BARTOSKOVA et al., 2014; GE et al., 2015). O aumento nos níveis de MDA é geralmente associado ao aumento nos níveis de EROs, culminando no estresse oxidativo (PAROLINI et al., 2018b; YAN et al., 2015).

No cérebro dos peixes expostos foram observados níveis de MDA abaixo dos observados no controle, na maioria das exposições na primeira semana de ensaio (Figura 20). Esse efeito não foi observado para COC 1000 ng L⁻¹ na primeira semana, apresentando uma tendência de aumento, a qual progrediu para um aumento significativo após 14 dias (Figura 20). Após 14 dias, apesar de aumentos significativos de MDA terem sido observados nas exposições

unitárias, as exposições combinadas não resultaram em alterações significativas. Já na terceira semana, níveis de MDA acima dos controles foram observados tanto nas exposições unitárias (COC 10 e BE 1000 ng L⁻¹), quanto combinadas (COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹) (Figura 20). Já no fígado, níveis de MDA abaixo do reportado nos controles foram observados de forma generalizada nas duas primeiras semanas de ensaio (7 e 14 dias), enquanto a terceira semana (21 dias) não apresentou alterações significativas para todas as exposições (Figura 20).

Não há trabalhos de investigação de níveis de LPO em peixes expostos à COC e BE disponíveis na literatura. A exposição do organismo aquático *Daphnia magna* à BE (0,5 e 1 µg L⁻¹) por 48 h, resultou em aumento nos níveis de EROs e de LPO para 1 µg L⁻¹, porém não foram observadas alterações significativas na exposição à 0,5 µg L⁻¹ (PAROLINI et al., 2018b). Segundo os autores, os aumentos observados para 1 µg L⁻¹ indicariam estresse oxidativo nos organismos, uma vez que as EROs não foram totalmente eliminadas pelos componentes antioxidantes, resultando em dano lipídico (PAROLINI et al., 2018b). Ao mesmo tempo, os achados de Parolini et al. (2018b) demonstraram um aumento significativo na atividade de GST para a exposição à 0,5 µg L⁻¹, sugerindo o a eliminação das espécies reativas para esta concentração de BE (PAROLINI et al., 2018b).

A exposição do crustáceo de água doce *Procambarus clarkii* por 14 dias à COC e BE (50 e 500 ng L⁻¹ de cada contaminante) não provocou alterações significativas nos níveis de LPO em brânquias e em glândulas digestivas dos organismos (DE FELICE et al., 2022). Segundo os autores, a tolerância de *P. clarkii* à estressores externos, incluindo contaminantes aquáticos, teria sido preponderante para os poucos efeitos observados (DE FELICE et al., 2022). De Felice et al. (2022) não observaram alterações significativas para SOD, GPx, GST e LPO em ambos os órgãos dos crustáceos expostos à COC e BE, excetuando-se apenas o aumento de atividade observado para SOD em brânquia na exposição à BE 500 ng L⁻¹ (DE FELICE et al., 2022).

Moluscos *Mytilus galloprovincialis* expostos por 48-96 h à COC (500 ng L⁻¹) e BE (20 ng L⁻¹) e à combinação destes contaminantes (COC 500 + BE 20 ng L⁻¹), não apresentaram aumentos significativos nos níveis de EROs e de LPO em brânquia (DE FELICE; PAROLINI, 2020). Entretanto, uma diminuição significativa nos níveis de LPO foi observada nesse órgão para a exposição combinada após 48 e 96 h, em conjunto com aumentos significativos nas atividades de SOD e GPx (DE FELICE; PAROLINI, 2020). Já nas glândulas digestivas dos moluscos expostos, não foram observadas alterações significativas para as exposições unitárias e combinadas, sugerindo que a ação dos biomarcadores antioxidantes foi eficaz na defesa dos organismos contra a produção de EROs e, conseqüentemente, contra o estresse oxidativo (DE

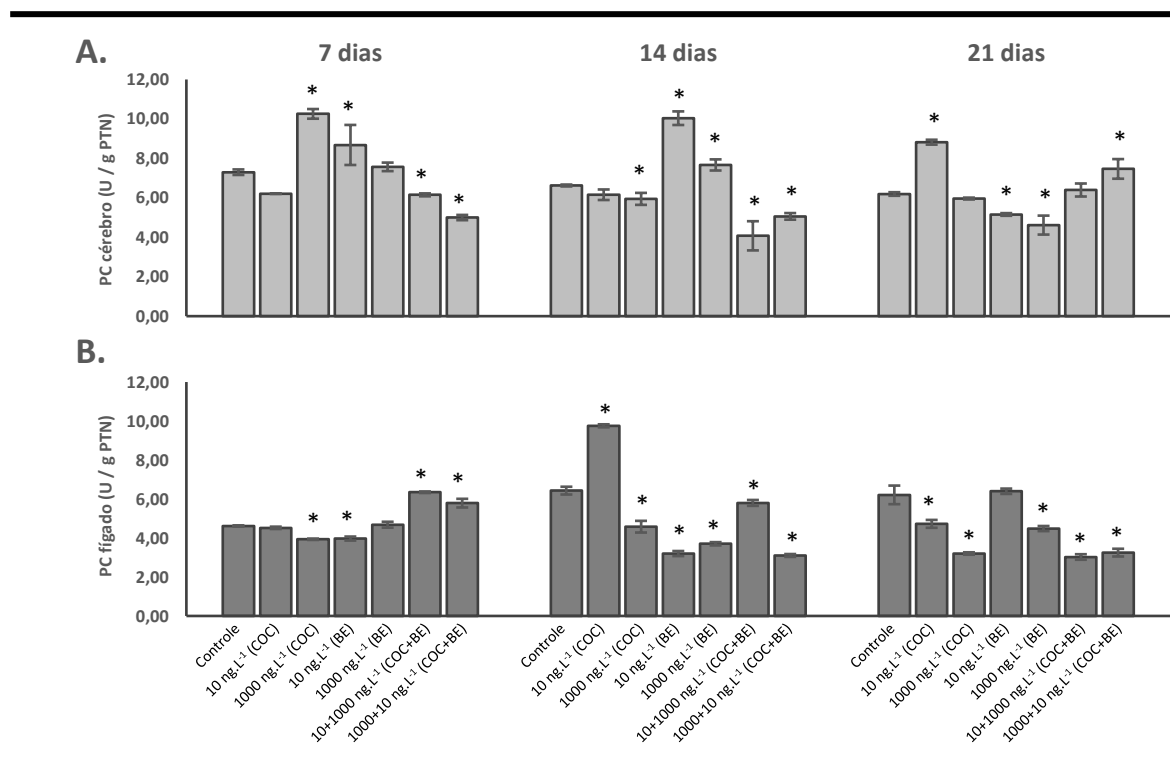
FELICE; PAROLINI, 2020). Moluscos *Dreissena polymorpha* expostos por 14 dias à COC, BE, anfetamina, morfina e 3,4-metilenodioximetanfetamina combinados (50-300 ng L⁻¹) não apresentaram alterações significativas nos níveis de LPO (PAROLINI et al., 2015). Os organismos apresentaram aumentos significativos na resposta antioxidante das atividades de SOD, CAT e GPx, no entanto, demonstraram aumentos significativos nos níveis PC, sugerindo agravos à saúde dos moluscos (PAROLINI et al., 2015).

Neste estudo, as diminuições significativas de MDA observadas na primeira semana para o órgão cérebro e ao longo do ensaio no órgão fígado, sugerem a ação do sistema antioxidante na defesa contra a produção de EROs decorrentes da exposição à COC e BE (Figura 20), assemelhando-se aos achados dos estudos relatados. Contudo, uma sobrecarga do sistema antioxidante parece ter ocorrido após 14 dias de exposição no órgão cérebro, resultando em aumentos na ocorrência de LPO e estresse oxidativo (Figura 20). Esses resultados indicaram uma maior susceptibilidade do cérebro dos peixes aos contaminantes, em comparação com o órgão fígado. Apesar disso, os níveis de MDA observados nas exposições combinadas não resultaram em feitos maiores que as exposições unitárias, corroborando com a hipótese de interação de atenuação entre os contaminantes (Figura 20).

5.3.6. Carbonilação de Proteínas (PC)

Os níveis de PC no cérebro e fígado dos peixes foram quantificados pelo protocolo de Mesquita et al. (2014) (Figura 21). A PC corresponde à modificação quantitativa de proteínas em decorrência do estresse oxidativo, geralmente desencadeado por radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (PEDRIALI et al., 2013). A alteração de proteínas em derivados carbonílicos é considerada irreversível, sendo utilizada como indicador de dano oxidativo a estas proteínas (PAROLINI et al., 2013; PEDRIALI et al., 2013).

Figura 21: Carbonilação de proteínas no cérebro e fígado dos peixes expostos. Resultados apresentados como média e desvio padrão dos níveis de carbonilação de proteínas. A = resultados no órgão cérebro; B = resultados no órgão fígado. Significância em relação aos controles de cada semana foram representadas com um * acima das colunas ($p \leq 0,05$).



Aumentos significativos nos níveis de PC foram identificados em todas as semanas de ensaio para o órgão cérebro, sendo principalmente observados nas exposições unitárias à COC e BE (Figura 21). As exposições combinadas resultaram em níveis de PC abaixo do observado nos controles nas duas primeiras semanas de ensaio, enquanto um aumento significativo foi observado apenas para COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹ após 21 dias (Figura 21). No fígado, semelhante ao observado para LPO (Figuras 20 e 21), diminuições significativas de PC foram identificadas na maioria das exposições em todas as semanas de ensaio, excetuando-se as exposições combinadas após 7 dias e a exposição unitária à COC 10 ng L⁻¹ após 14 dias (Figura 21).

Não há trabalhos de avaliação de níveis de PC em peixes expostos à COC e BE na literatura. Bivalves *Dreissena polymorpha* expostos por 14 dias à BE (0,5 e 1 µg L⁻¹), apresentaram aumentos significativos nos níveis de PC em brânquias para ambas as concentrações (PEDRIALI et al., 2013). Segundo os autores, a exposição à BE pode ter causado estresse oxidativo transitório, resultando glutationação de proteínas, culminando na PC identificada principalmente na exposição à BE 1 µg L⁻¹, demonstrando sua atuação na alteração

do status redox nas brânquias dos organismos (PEDRIALI et al., 2013). Em outro estudo, a exposição de bivalves *Dreissena polymorpha* por 14 dias à BE (0,5 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$), resultou em aumentos significativos nos níveis de PC à 4, 7 e 14 dias de ensaio para BE 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, não sendo observadas alterações significativas para BE 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (PAROLINI et al., 2013). Uma resposta semelhante foi observada também nos níveis de LPO nos bivalves expostos à ambas as concentrações, em conjunto com inibições significativas nas atividades de SOD, CAT, GPx e GST após 11 dias (PAROLINI et al., 2013). Segundo os autores, os resultados à exposição à BE 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ confirmam a toxicidade do contaminante e seu envolvimento no estresse oxidativo nos organismos avaliados (PAROLINI et al., 2013).

A exposição à combinação de diferentes drogas de abuso em concentrações ambientais (COC 50 ng L^{-1} , BE 300 ng L^{-1} , anfetamina 300 ng L^{-1} , morfina 100 ng L^{-1} e 3,4-metilenodioximetanfetamina 50 ng L^{-1}) por 14 dias, resultou no aumento significativo dos níveis de PC em *Dreissena polymorpha* (PAROLINI et al., 2015). Segundo os autores, os resultados representaram agravos à saúde dos organismos por alterações na estrutura e na função de proteínas (PAROLINI et al., 2015).

Neste estudo, as diminuições significativas nos níveis de PC observadas no fígado dos peixes parecem indicar uma ação do sistema antioxidante na defesa contra a produção de espécies reativas. Embora tenham sido observados aumentos significativos nos níveis de PC no fígado após 7 dias de ensaio nas exposições combinadas, o sistema antioxidante parece ter lidado com a exposição, pelas diminuições observadas nessas exposições após 14 e 21 dias (Figura 21), denotando menos efeitos em relação à literatura relacionada (no fígado). No cérebro, a PC parecer ter sido associada principalmente às exposições unitárias de COC e BE ao longo do ensaio, resultando na modulação permanente de proteínas, decorrente de estresse oxidativo. Embora a exposição à COC 1000 + BE 10 ng L^{-1} tenha demonstrado um aumento significativo para PC após 21 dias, esta não apresentou um efeito maior que o relatado para a exposição unitária de COC no referido tempo de exposição (Figura 21), indicando uma atenuação do efeito esperado para a exposição combinada.

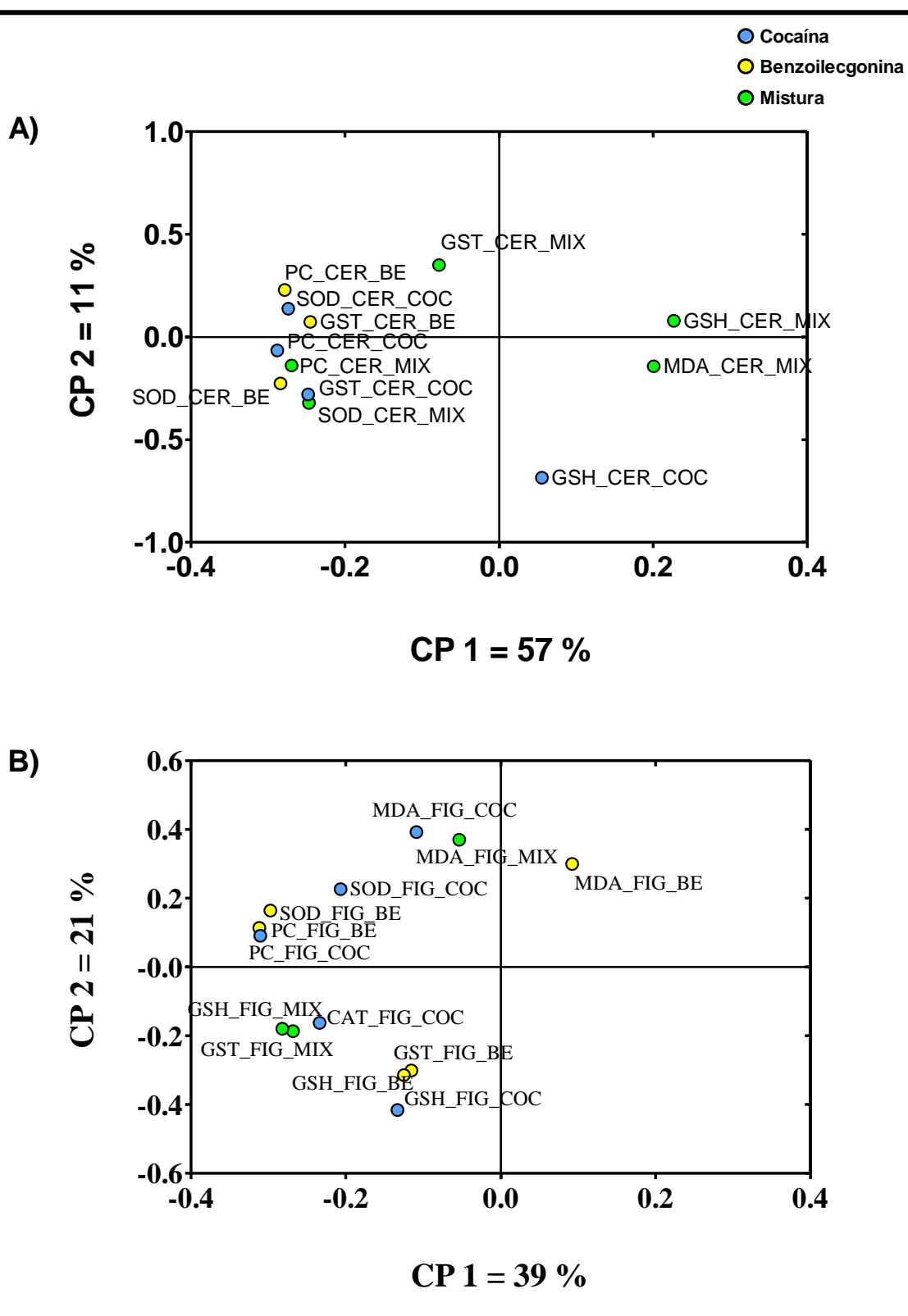
5.3.7. Análise de componentes principais (ACP)

A análise de componentes principais associou os biomarcadores do sistema antioxidante a duas componentes principais, compartilhando 60 % de toda a variância para o fígado (Figura 22) e 68 % para o cérebro (Figura 22). No cérebro, foi observado que SOD e PC, na presença de COC, demonstraram-se negativamente associados em CP1, mostrando que o aumento da atividade de SOD, resulta na redução da carbonilação de proteína (Figura 22).

Este resultado sugere que o H_2O_2 , produzido pela SOD foi degradado por TOT (GSH), não permitindo seu acúmulo (H_2O_2). Quanto aos comportamentos de GST e PC na mesma componente (CP1), observou-se uma associação moderadamente positiva ($\rho^2 = 0,74$; $p > 0,05$). Esse resultado evidenciaria uma tentativa do sistema antioxidante em metabolizar a COC, gerando potencialmente um subproduto e, assim, o aumento da PC. O mesmo comportamento teria sido observado para a exposição à BE no referido órgão.

Associações diferentes foram observadas no cérebro quando analisadas as exposições combinadas de COC e BE (Figura 22 e Anexo V). SOD e PC associaram-se positivamente ($\rho^2 = 0,68$; $p > 0,05$), sugerindo que o H_2O_2 produzido pela ação da SOD, não foi degradado por TOT, levando ao acúmulo desta espécie reativa. No cérebro, onde a atividade de CAT não é detectada, o aumento exagerado da atividade de SOD poderia sobrecarregar a ação de TOT, acumulando H_2O_2 . Também destaca-se a associação negativa entre GST e PC na mistura de COC e BE, mostrando que a atividade da GST foi capaz de atuar na redução da PC em CP1. Observando-se CP2, GST foi associada negativamente ao biomarcador de peroxidação lipídica MDA ($\rho^2 = -0,26$; $p < 0,05$), demonstrando, neste caso, a atuação de GST também na metabolização de compostos responsáveis pela LPO, reduzindo este efeito oxidativo no cérebro dos peixes expostos à mistura de COC e BE.

Figura 22: Análise de componentes principais no cérebro (A) e no fígado (B) dos peixes expostos à COC e BE.



A ACP mostrou que SOD esteve positivamente associada à PC ($\rho^2 = 0,54$; $p > 0,05$) e MDA ($\rho^2 = 0,29$; $p > 0,05$) na presença de COC no fígado (Figura 22), sugerindo um acúmulo de H_2O_2 não combatido por CAT e GSH, levando aos efeitos oxidativos de LPO e PC, semelhante ao observado no cérebro (Figura 22). Dessa forma, as associações negativas de CAT com MDA e PC, e de GSH com MDA e PC parecem corroborar com esse fato, indicando que a redução da atividade de CAT e dos níveis de GSH, resultam no aumento de MDA e PC no fígado dos peixes expostos à COC. O mesmo comportamento teria sido observado para BE no fígado. Já em relação a mistura de COC e BE, a ACP mostrou que a ação de GST e GSH estiveram associadas positivamente, indicando que a GSH foi majoritariamente utilizada como substrato da GST durante o processo de eliminação de compostos, conduzindo à redução da LPO, uma vez observada a associação negativa entre esses biomarcadores na CP2 (Figura 22).

Diante dos resultados discutidos após a ACP, é possível observar que a ação de COC e BE no cérebro, não parece ter resultado no acúmulo de H_2O_2 . No entanto, a ação de GST teria gerado subprodutos associados à carbonilação de proteínas, uma vez observada a associação positiva entre GST e PC no referido órgão. Já no fígado, foram observados efeitos opostos aos vistos no cérebro, pelo acúmulo de H_2O_2 decorrente da exposição a COC e a BE, redundando no aumento de MDA e PC. Já a exposição à mistura de COC e BE resultou no aumento da atividade de GST e GSH, os quais teriam sido capazes de impedir o acúmulo de H_2O_2 , combatido o aumento dos efeitos oxidativos de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

5.3.8. Aspectos gerais – Ensaio crônico

Os biomarcadores antioxidantes avaliados nos peixes adultos indicaram respostas significativas em relação aos controles, sendo observadas principalmente para as exposições unitárias no cérebro (órgão alvo da cocaína). A exposição à COC e BE foi capaz de causar estresse oxidativo nos órgãos dos peixes, acarretando peroxidação lipídica no cérebro a partir de 14 dias de ensaio e carbonilação de proteínas no referido órgão a partir de 7 dias (Figuras 20 e 21). No fígado, os efeitos nos biomarcadores antioxidantes teriam sido associados principalmente à BE, devido à sua ação tóxica enquanto metabólito ativo. Diminuições significativas foram observadas na maioria das exposições para os biomarcadores MDA e PC no fígado, sugerindo uma ação efetiva antioxidante na proteção do organismo (Figuras 20 e 21). TOT parece ter sido o principal biomarcador antioxidante a atuar na defesa do organismo no cérebro (Figura 19). Entretanto, a defesa antioxidante do organismo no fígado parece ter sido atribuída mais fortemente a um conjunto de antioxidantes, recomendando-se novos

estudos para sua compreensão mais detalhada, pela análise de outros biomarcadores como a enzima GPx.

As exposições combinadas provocaram respostas antioxidantes nos órgãos dos peixes (principalmente no cérebro). Contudo, ao final do ensaio não foram observados aumentos significativos nessas exposições para os biomarcadores MDA e PC no fígado, denotando a efetividade da ação do sistema antioxidante neste órgão. Apesar dos aumentos significativos associados à COC 1000 + BE 10 ng L⁻¹ observados nos diferentes biomarcadores no cérebro, estes não demonstraram efeitos acima dos verificados nas exposições unitárias de COC e BE ao longo do ensaio, sugerindo-se uma interação de atenuação entre os contaminantes.

Com isso, embora concentrações ambientais de COC e BE sejam consideradas baixas (ng e µg L⁻¹), o risco para comunidades aquáticas não deve ser descartado, uma vez que drogas psicoativas apresentam atividade farmacológica ativa (PAROLINI et al., 2017), conforme demonstrado neste estudo, principalmente para o órgão cérebro. Embora menores efeitos da combinação ente COC e BE tenham sido sugeridos nos resultados deste estudo, pouco ainda é conhecido sobre a combinação de misturas complexas desses contaminantes com outros componentes ativos no ambiente (PAROLINI et al., 2017), principalmente considerando-se os níveis de COC e BE associados à esgotos relatados nos rios urbanos investigados neste estudo.

6. CONCLUSÃO

COC e seu principal metabólito (BE) foram investigados quanto à presença em águas superficiais (rios urbanos) no Rio de Janeiro e avaliados quanto aos efeitos ecotoxicológicos de seus níveis ambientais em ensaio agudo (96 h) com embriões de *zebrafish* e ensaio crônico com *zebrafish* adultos por 21 dias.

A determinação de COC e BE em rios e canais no Rio de Janeiro revelou concentrações acima do LQ em 100 % das amostras ao longo de 8 meses de monitoramento. O perfil de consumo de COC na cidade seria um dos fatores mais preponderantes na detecção, uma vez que as maiores concentrações não foram necessariamente associadas à maiores parâmetros relacionados a esgotos, mas correspondentes aos meses de dezembro e janeiro, quando é esperado aumento do número de turistas na cidade pela combinação entre o pico do verão e época de férias. As concentrações investigadas também alertam para o aporte de esgotos nos rios urbanos da cidade, uma vez que por vezes foram identificadas acima das observadas em afluentes de ETE ao redor do mundo. O cenário de degradação ambiental e problemática de saúde ambiental descritos sinalizou riscos no equilíbrio de ambientes aquáticos, sobretudo a organismos não-alvo.

Mesmo concentrações ambientais de COC e BE consideradas baixas (ng e $\mu\text{g L}^{-1}$) provocaram alterações morfológicas e teratogênicas nos embriões de *zebrafish*, já nas primeiras 24 h de ensaio. O córion dos peixes não conferiu isenção frente à toxicidade dos contaminantes testados, destacando-se BE, por seus maiores efeitos morfológicos, teratogênicos e casos de mortes em relação à COC. Os resultados deste estudo enfatizaram o risco associado às concentrações ambientais desses contaminantes para a biota aquática não-alvo nos primeiros estágios de vida.

Os peixes adultos também apresentaram efeitos deletérios decorrentes da exposição às concentrações ambientais de COC e BE, demonstrados pela modulação de biomarcadores antioxidantes e, principalmente, pela ocorrência de estresse oxidativo, acarretando peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no cérebro dos organismos. O órgão cérebro apresentou os maiores efeitos, uma vez que corresponde ao órgão alvo de COC. As exposições combinadas de COC e BE resultaram em menores efeitos em relação à exposições unitárias, sugerindo uma interação de atenuação entre os contaminantes. Maiores investigações são recomendadas para detalhamento da defesa antioxidante do organismo à COC e BE, sobretudo no fígado, pela análise de biomarcadores como a enzima glutathione peroxidase. Os efeitos aos peixes adultos demonstram os riscos

associados à toxicidade de COC e BE à organismo aquático não-alvo, mesmo após completada sua maturidade sexual.

Com isso, conclui-se que COC e BE não apenas estão presentes nos rios cariocas, mas podem ser encontrados em concentrações comparáveis às encontradas em esgotos, apresentando capacidade para causar danos a organismos e impactar potencialmente sistemas ecológicos, deflagrando um alarmante problema de saúde pública e meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ACCORNERO, V. H. et al. Impact of Prenatal Cocaine Exposure on Attention and Response Inhibition as Assessed by Continuous Performance Tests. **Behavioral Pediatrics**, v. 28, n. 3, p. 11, 2007.
- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGHAZADEH TABRIZI, M. **Handbook of cannabis and related pathologies: biology, pharmacology, diagnosis, and treatment**. London: Elsevier/Academic Press, 2017.
- ALERTA RIO. **Dados Pluviométricos**. Brasil, 2023. Disponível em: <http://alertario.rio.rj.gov.br/download/dados-pluviometricos>. Acesso em: 1 jun. 2022.
- AL-GHANANEEM, A.; CROOKS, P. Phase I and Phase II Ocular Metabolic Activities and the Role of Metabolism in Ophthalmic Prodrug and Codrug Design and Delivery. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 373–388, 8 mar. 2007.
- ANVISA. **Resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasil, 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html. Acesso em: 2 abr. 2023.
- ARAUJO, G. D. F. et al. Oxidative stress and metal homeostasis alterations in Danio rerio (zebrafish) under single and combined carbamazepine, acetamiprid and cadmium exposures. **Aquatic Toxicology**, v. 245, p. 106122, abr. 2022.
- ASIMAKOPOULOS, A. G. et al. Determination of 89 drugs and other micropollutants in unfiltered wastewater and freshwater by LC-MS/MS: an alternative sample preparation approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 26, p. 6205–6225, out. 2017.
- AVMA - AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition**. 2013. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2020.
- BAKER, D. R. et al. Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter — Further developments in sewage epidemiology. **Environment International**, v. 48, p. 28–38, nov. 2012.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006.
- BARRETO-VALER, K. et al. Modulation by Cocaine of Dopamine Receptors through miRNA-133b in Zebrafish Embryos. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52701, 21 dez. 2012.
- BARRETO-VALER, K.; LÓPEZ-BELLIDO, R.; RODRÍGUEZ, R. E. Cocaine modulates the expression of transcription factors related to the dopaminergic system in zebrafish.

Neuroscience, v. 231, p. 258–271, fev. 2013.

BARTOSKOVA, M. et al. Norfloxacin—Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

BÍBLIA SAGRADA, A. T. **Provérbios**. A Bíblia Sagrada - Antigo e Novo Testamento. Traduzida por João Ferreira de Almeida. Ed. Revista e Atualizada. Sociedade Bíblica do Brasil. DF, Brasil, 1969.

BIJLSMA, L. et al. Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). **Science of The Total Environment**, v. 487, p. 703–709, 15 jul. 2014.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Cocaine potentiates defensive behaviors related to fear and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, p. 11, 1999.

BOEHMLER, W. et al. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 2, p. 155–166, 2007.

BONDARENKO, E. A. et al. Main inorganic ions and electric conductivity of polluted urban streams. **Magazine of Civil Engineering**, v. 68, n. 08, p. 37–44, abr. 2017.

BOOZE, R. et al. Dose-response cocaine pharmacokinetics and metabolite profile following intravenous administration and arterial sampling in unanesthetized, freely moving male rats. **Neurotoxicology and teratology**, v. 19, n. 1, p. 7–15, 1997.

BORSKI, R. J.; HODSON, R. G. Fish Research and the Institutional Animal Care and Use Committee. **ILAR Journal**, v. 44, n. 4, p. 286–294, 1 jan. 2003.

BRASIL. **Resolução CONAMA N° 274, de 29 de novembro de 2000**. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Publicada no DOU no 18, de 25 de janeiro de 2001, Seção 1, páginas 70-71. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasil, 2000.

BRASIL. **Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no DOU n° 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasil, 2005.

BRASIL. ABNT NBR 15088/16. **Ecotoxicologia aquática** - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). 3 Ed. Brasil, 2016.

BROCK, A. J. et al. Assessing the Value of the Zebrafish Conditioned Place Preference Model for Predicting Human Abuse Potential. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 363, n. 1, p. 66–79, out. 2017.

CAMPESTRINI, I.; JARDIM, W. F. Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 576, p. 374–380, jan. 2017a.

CAMPESTRINI, I.; JARDIM, W. F. Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 374–380, 15 jan. 2017b.

CAÑEDO-ARGÜELLES, M. et al. Salinisation of rivers: An urgent ecological issue. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 157–167, fev. 2013.

CASTIGLIONI, S. et al. Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 1452–1460, 5 fev. 2013.

CBH BAÍA DE GUANABARA. **Enquadramento 2023**. Disponível em: <https://comitebaiadeguanabara.org.br/enquadramento>. Acesso em: 4 abr. 2023.

CCAC - CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing**. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 2005.

CETESB. **Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: Água, Sedimento, Comunidades Aquáticas E Efluentes Líquidos**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011.

CHALEGRE-TOUCEIRA, M. C. et al. Water Quality Evolution of Rio de Janeiro City Beaches. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 286–298, 28 jun. 2018.

CLESCERI, L. S.; GREENBAERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, v. 552, p. 5–16, 1998.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasil, 2015.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasil, 2023. Disponível em: https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia_concea_1ed_animais-_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf. Acesso em: 13 mai. 2023.

CONCEA RN 37/2018 - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Se refere aos procedimentos de eutanásia realizados em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica. Brasil, 2018.

CONE, E. J. et al. Cocaine Metabolism and Urinary Excretion After Different Routes of Administration. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 20, n. 5, 1998.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CREMLYN, R. J. W. **An introduction to organosulfur chemistry**. Chichester ; New York: Wiley, 1996.

CUBO, E. Cocaine. Em: **Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 811–813.

DA SILVA, K. M. et al. Assessing cocaine use patterns in the Brazilian Capital by wastewater-based epidemiology. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 15, p. 1370–1387, 8 dez. 2018.

DAGLIOGLU, N.; GUZEL, E. Y.; KILERCIOGLU, S. Assessment of illicit drugs in wastewater and estimation of drugs of abuse in Adana Province, Turkey. **Forensic Science International**, v. 294, p. 132–139, jan. 2019.

DARLAND, T. et al. Sulpiride, but not SCH23390, modifies cocaine-induced conditioned place preference and expression of tyrosine hydroxylase and elongation factor 1 α in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 157–167, dez. 2012.

DARLAND, T.; DOWLING, J. E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11691–11696, 25 set. 2001.

DE FARIAS ARAUJO, G. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model to assess the effects of cocaine as a drug of abuse and its environmental implications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 11, p. 28459–28479, 23 jan. 2023.

DE FELICE, B. et al. Differential biochemical and behavioral responses induced by cocaine and benzoylecgonine exposure to the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Science of The Total Environment**, v. 844, p. 157025, out. 2022.

DE FELICE, B.; PAROLINI, M. Effects of single and combined exposure to cocaine and benzoylecgonine on the oxidative status of *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 103475, nov. 2020.

DEKENS, M. P. S. et al. Light Regulates the Cell Cycle in Zebrafish. **Current Biology**, v. 13, n. 23, p. 2051–2057, dez. 2003.

DELANEY-BLACK, V. et al. Prenatal and postnatal cocaine exposure predict teen cocaine use. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 1, p. 110–119, 2011.

DELAUNAY, F. et al. An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. **Science**, v. 289, n. 5477, p. 297–300, 2000.

DEVAULT, D. A.; LÉVI, Y.; KAROLAK, S. Applying sewage epidemiology approach to estimate illicit drug consumption in a tropical context: Bias related to sewage temperature and pH. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 252–258, abr. 2017.

DOCIMO, T. et al. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 6, p. 599–615, abr. 2012.

EMCDDA - EUROPEAN MONITORING CENTRE FOR DRUGS AND DRUG ADDICTION. **Assessing illicit drugs in wastewater**: advances in wastewater based drug epidemiology. LU: Publications Office, 2016.

EPA. **Method 542**: Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS). United States Environmental Protection Agency. p. 39, 2016.

FÁVERO, L.; BELFIORE, P. **Análise de dados: técnicas multivariadas exploratórias**. 1. ed. Brasil: Elsevier Brasil, 2015.

FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: Ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, SBQ, Brasil, 2013a.

FEITOSA, R. S.; SODRÉ, F. F.; MALDANER, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determinação e aplicações forenses. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 291–305, 2013b.

FENG, Q. Postnatal consequences of prenatal cocaine exposure and myocardial apoptosis: does cocaine in utero imperil the adult heart? **British journal of pharmacology**, v. 144, n. 7, p. 887–888, abr. 2005.

FILIPPI, A. et al. Expression and function of nr4a2, lmx1b, and pitx3 in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. **BMC Developmental Biology**, p. 21, 2007.

FONTES, M. K. et al. Seasonal monitoring of cocaine and benzoylecgonine in a subtropical coastal zone (Santos Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110545, dez. 2019a.

FONTES, M. K. et al. Seasonal monitoring of cocaine and benzoylecgonine in a subtropical coastal zone (Santos Bay, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110545, 1 dez. 2019b.

FONTES, M. K. et al. Mussels get higher: A study on the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in seawater, sediment and mussels from a subtropical ecosystem (Santos Bay, Brazil). **Science of The Total Environment**, v. 757, p. 143808, fev. 2021.

FOPPE, K. S.; HAMMOND-WEINBERGER, D. R.; SUBEDI, B. Estimation of the consumption of illicit drugs during special events in two communities in Western Kentucky, USA using sewage epidemiology. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 249–256, 15 ago. 2018.

FOULON, C. et al. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine, and cocaethylene in urine, serum, and saliva by isocratic high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Chromatographia**, v. 50, n. 11–12, p. 721–727, dez. 1999.

FRANK, D. A. et al. Growth, Development, and Behavior in Early Childhood Following

Prenatal Cocaine Exposure A Systematic Review. **JAMA**, 2001.

FUKUSHIMA, A. R. et al. Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. **Forensic Science International**, v. 243, p. 95–98, out. 2014.

GARCÍA-CAMBERO, J. P. et al. Environmental concentrations of the cocaine metabolite benzoylecgonine induced sublethal toxicity in the development of plants but not in a zebrafish embryo–larval model. **Journal of Hazardous Materials**, v. 300, p. 866–872, dez. 2015.

GAUTHIER, P. T.; VIJAYAN, M. M. A rapid zebrafish embryo behavioral biosensor that is capable of detecting environmental b-blockers. **Environmental Pollution**, p. 10, 2019.

GE, W. et al. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1856–1862, 18 fev. 2015.

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 67, n. 4, p. 773–782, 2000.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. A. Z. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. **Chemosphere**, v. 138, p. 281–291, 1 nov. 2015.

GOLDMAN, D. et al. Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration. **Transgenic research**, v. 10, n. 1, p. 21–33, 2001.

GOMES, T. B. et al. Sublethal psychotropic pharmaceutical effects on the model organism *Danio rerio*: Oxidative stress and metal dishomeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, p. 781–789, abr. 2019.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I. et al. Spatio-temporal assessment of illicit drug use at large scale: evidence from 7 years of international wastewater monitoring. **Addiction**, v. 115, n. 1, p. 109–120, 2020.

GREWEN, K. et al. Prenatal cocaine effects on brain structure in early infancy. **NeuroImage**, v. 101, p. 114–123, 1 nov. 2014.

GUARIENTI, M. et al. Biosafe inertization of municipal solid waste incinerator residues by COSMOS technology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 311–321, ago. 2014.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press. v. 1. 2007.

HEDGESPETH, M. L.; NILSSON, P. A.; BERGLUND, O. Assessing potential vulnerability and response of fish to simulated avian predation after exposure to psychotropic

pharmaceuticals. **Toxics**, v. 4, n. 2, p. 9, 2016.

HEFFELFINGER, A.; CRAFT, S.; SHYKEN, J. Visual attention in children with prenatal cocaine exposure. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 3, n. 3, p. 237–245, 1997.

HEFFELFINGER, A. K. et al. Visual attention in preschool children prenatally exposed to cocaine: implications for behavioral regulation. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 8, n. 1, p. 12–21, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Resultados do Censo 2010**. Brasil, 2010. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br/resultados>. Acesso em: 20 set. 2016.

INEA - INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. **Enquadramento dos Corpos de Água em Classes**. Enquadramentos Existentes no Estado. Brasil, 2023. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/ar-agua-e-solo/enquadramento-dos-corpos-dagua/>. Acesso em: 4 mai. 2022.

INEA INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. **Boletim de qualidade das águas da Região Hidrográfica V - Baía de Guanabara**. Índices de Qualidade de Água. Nº 4., 2019a.

INEA INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. **Boletim consolidado de qualidade das águas da Região Hidrográfica II - Guandu**. Índices de Qualidade de Água., 2019b.

IRONS, T. D. et al. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 1, p. 84–90, jan. 2010.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3–8, jan. 2012.

JORDÃO, E.; PESSÔA, C. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. Rio de Janeiro, 2014.

KACPRZAK, V. et al. Dopaminergic control of anxiety in young and aged zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 157, p. 1–8, jun. 2017.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 13, 2014.

KARKI, A. J. et al. New efficient methodology for screening of selected organic micropollutants in raw- and drinking water from 90 Swedish water treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 724, p. 138069, 1 jul. 2020.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water research**, v. 42, n. 13, p. 3498–3518, 2008.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment – Forensic applications of environmental data. Part 1:

Estimation of the usage of drugs in local communities. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 6, p. 1773–1777, jun. 2009.

KIM, J. et al. A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons. **Science**, v. 317, p. 6, 2007.

KIM, K. Y. et al. Effects of the summer holiday season on UV filter and illicit drug concentrations in the Korean wastewater system and aquatic environment. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 587–595, ago. 2017.

KIRLA, K. T. et al. From the Cover: Zebrafish Larvae Are Insensitive to Stimulation by Cocaine: Importance of Exposure Route and Toxicokinetics. **Toxicological Sciences**, v. 154, n. 1, p. 183–193, nov. 2016.

KOMBIAN, S. B. et al. Dopamine and adenosine mediate substance P-induced depression of evoked IPSCs in the rat nucleus accumbens in vitro. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 303–311, 1 jul. 2003.

KONDOR, A. C. et al. Occurrence of pharmaceuticals in the Danube and drinking water wells: Efficiency of riverbank filtration. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114893, out. 2020.

LEE, C.-T. et al. A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. **PLoS Med**, v. 5, n. 6, p. e117, 2008.

LENAD. **Levantamento Nacional de Álcool e Drogas**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Brasil, 2012. Disponível em: <https://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-II-Relat%C3%B3rio.pdf>. Acesso em 6 mai. 2021.

LEVIN, E. D.; CHEN, E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 26, n. 6, p. 731–735, 2004.

LIN, W. O.; BRAGA, C. P.; YAMAWAKI, S. M. **Drinking water from blackwater of Rio Negro/Amazonia**. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005.

LIU, J.; LESTER, B., M. Reconceptualizing in a dual-system model the effects of prenatal cocaine exposure on adolescent development: a short review. **International Journal of Developmental Neuroscience**, p. 7, 2011.

LÓPEZ-BELLIDO, R.; BARRETO-VALER, K.; RODRÍGUEZ, R. E. Expression of tachykinin receptors (*tacr1a* and *tacr1b*) in zebrafish: influence of cocaine and opioid receptors. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 50, n. 2, p. 115–129, 2013b.

LÓPEZ-BELLIDO, R.; BARRETO-VALER, K.; RODRÍGUEZ, R. E. Substance P mRNA expression during zebrafish development: influence of mu opioid receptor and cocaine. **Neuroscience**, v. 242, p. 53–68, 2013a.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Gender differences in zebrafish responses to cocaine

withdrawal. **Physiology & Behavior**, v. 95, 36–47, p. 12, 2008b.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 1–2, p. 160–171, 2008a.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

MACKULAK, T. et al. Music festivals and drugs: Wastewater analysis. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 326–334, 1 abr. 2019.

MACKULAK, T. et al. Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms — environmental impact on population health. **Environmental Chemistry: Sewage Epidemiology**, v. 9, p. 40–48, 2019b.

MAGALHÃES, E. J. et al. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. **Science & Justice**, v. 53, n. 4, p. 425–432, dez. 2013.

MALDANER, A. O. et al. Estimating cocaine consumption in the brazilian federal district (FD) by sewage analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 5, p. 861–867, 2012.

MARAJ, S.; FIGUEREDO, V. M.; LYNN MORRIS, D. Cocaine and the Heart. **Clinical Cardiology**, v. 33, n. 5, p. 264–269, maio 2010.

MARKOU, A.; KOOB, G. F. Postcocaine anhedonia: An animal model of cocaine withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 17–26, 1991.

MASON, H. S.; INGRAM, D. J. E.; ALLEN, B. The free radical property of melanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 86, n. 2, p. 225–230, 1 fev. 1960.

MASTROIANNI, N. et al. Occurrence of drugs of abuse in surface water from four Spanish river basins: Spatial and temporal variations and environmental risk assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 134–142, out. 2016.

MERSEREAU, E. et al. Longitudinal Effects of Embryonic Exposure to Cocaine on Morphology, Cardiovascular Physiology, and Behavior in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 847, 31 maio 2016.

MERSEREAU, E. J. et al. The effects of cocaine on heart rate and electrocardiogram in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 172–173, p. 1–6, jun. 2015.

MESQUITA, C. S. et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69–71, ago. 2014.

METCALFE, C. et al. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 10, p. 3179–3185, out. 2010.

MEYER, K. D.; ZHANG, L. Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 3, n. 1, p. 7–16, fev. 2009.

MEYER, S.; SHERLOCK, D.; MACDONALD, R. Effects of Prenatal Cocaine on Behavioral Responses to a Cocaine Challenge on Postnatal Day 11. **Neurotoxicology and teratology**, p. 7, 1992.

MINNES, S. et al. Effects of prenatal cocaine/polydrug exposure on substance use by age 15. **Drug and alcohol dependence**, v. 134, p. 201–210, 1 jan. 2014.

MONSINJON, T.; KNIGGE, T. Proteomic applications in ecotoxicology. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2997–3009, 2007.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, 11 jul. 2017a.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 11 jul. 2017b.

MOOLCHAN, E. T. et al. Cocaine and Metabolite Elimination Patterns in Chronic Cocaine Users During Cessation: Plasma and Saliva Analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 24, n. 7, p. 458–466, 1 out. 2000.

MORISHIMA, H. O. et al. The comparative toxicity of cocaine and its metabolites in conscious rats. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 90, n. 6, p. 1684–1690., 1999.

MORISHIMA, H. O. et al. The disposition of benzoylecgonine in maternal and fetal rats. **Neurotoxicology and teratology**, v. 23, n. 3, p. 247–253, 2001.

MORISHIMA, H. O.; WHITTINGTON, R. A. Species-, gender-, and pregnancy-related differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. **NIDA research monograph**, v. 158, p. 2–21, 1995.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 446220, Cocaine**. NIH - National Library of Medicine, 2021a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cocaine>. Acesso em 5 mai. 2021.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 448223, Benzoylecgonine**. NIH - National Library of Medicine, 2021b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/O-Benzoylecgonine>. Acesso em 5 mai. 2021.

NIDA - NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Cocaine Research Report**. National Institutes of Health. EUA., 2016. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine/what-cocaine>. Acesso em 5 mai. 2021. Acesso em 29 abr. 2021.

NINKOVIC, J. et al. Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-amphetamine in zebrafish. **Journal of neurobiology**, v. 66, n. 5, p. 463–475, 2006.

OBID - OBSERVATÓRIO BRASILEIRO SOBRE DROGAS. **Relatório Brasileiro sobre Drogas**. Brasil, 2009. Disponível em: http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/cuidados_prevencao_drogas/obid/publicacoes/Livros/Relatorio%20Brasileiro%20sobre%20Drogas%20-%202010.pdf. Acesso em 6 mai. 2021.

OECD 203 - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guideline for testing of chemicals**. Fish, Acute Toxicity Test. 1992.

OECD 236 - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the testing of chemicals**. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264203709-en>. Acesso em 15 abr. 2021.

OPOLKA, A. et al. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. **Arthritis & Rheumatism**. Vol. 64, No. 3, March 2012, pp 729–739, p. 11, 2012.

OVERTON, P. G.; DEVONSHIRE, I. M. Cocaine facilitates craving via an action on sensory processing. **Bioscience Hypotheses**, v. 1, n. 2, p. 70–77, 2008.

PAROLINI, M. et al. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Science of The Total Environment**, v. 444, p. 43–50, 1 fev. 2013.

PAROLINI, M. et al. Realistic mixture of illicit drugs impaired the oxidative status of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 128, p. 96–102, jun. 2015.

PAROLINI, M. et al. Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 504–514, jul. 2017.

PAROLINI, M. et al. Exposure to cocaine and its main metabolites altered the protein profile of zebrafish embryos. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 603–614, jan. 2018a.

PAROLINI, M. et al. Benzoylecgonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 236–244, jan. 2018b.

PAROLINI, M.; BINELLI, A. Adverse effects induced by ecgonine methyl ester to the zebra mussel: A comparison with the benzoylecgonine. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 371–378, 1 nov. 2013.

PAVLOVA, V. et al. Studying electrode mechanism and analytical determination of cocaine and its metabolites at the mercury electrode using square-wave voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 512, n. 1, p. 49–56, jun. 2004.

PDRH. **Plano Diretor de Recursos Hídricos da Região Hidrográfica da Baía de Guanabara**. Consórcio Ecologus-Agrar. Governo do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Despoluição da Baía de Guanabara. Brasil, 2005. Disponível em: <https://playquiz.com.br/cbh2/wp-content/uploads/2022/09/Plano-Diretor-de-Recursos-Hidricos-da-Baia-de-Guanabara-outubro-2005.pdf>. Acesso em 4 abr. 2023.

PEDRIALI, A. et al. A redox proteomic investigation of oxidative stress caused by benzoylecgonine in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*: A redox proteomic investigation of oxidative stress caused by benzoylecgonine in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. **Drug Testing and Analysis**, v. 5, n. 8, p. 646–656, ago. 2013.

PENNEFATHER, J. N. et al. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sciences**, v. 74, n. 12, p. 1445–1463, fev. 2004.

PEREIRA, C. D. S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of The Total Environment**, v. 548–549, p. 148–154, abr. 2016.

PERHI - PLANO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Relatório Gerencial**. Governo do Estado do Rio de Janeiro. Secretaria de Estado do Ambiente. Instituto Estadual do Ambiente - INEA. Fundação COPPETEC. Brasil, 2014.

PETERSON, R. T. et al. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. p. 10, 2008.

PISERA-FUSTER, A. et al. Sensitization-dependent nicotine place preference in the adult zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 92, p. 457–469, jun. 2019.

PISETTA, A.-M. et al. First report on the occurrence of pharmaceuticals and cocaine in the coastal waters of Santa Catarina, Brazil, and its related ecological risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 63099–63111, set. 2022.

PMSB. **Plano de Saneamento Municipal do Rio de Janeiro**. Diário Oficial do Município do Rio de Janeiro - Poder Executivo, Ano XXV, Nº 107, Terça-feira, 16 de Agosto de 2011, Parte integrante. Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. Brasil, 2011.

PMSB. **Plano Municipal de Saneamento Básico da Cidade do Rio De Janeiro**. Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saneamento e Recursos Hídricos. Fundação Instituto das Águas. Baseado e Adaptado do Plano Diretor de Manejo de Águas Pluviais da Cidade do Rio de Janeiro - Fundação Rio-Águas e Consórcio Hidrostudio - Fcth (Hidrostudio Engenharia Ltda – Fundação Centro Tecnológico de Hidráulica). Contrato 027/2009, Concorrência 003/2008. Brasil, 2015. Disponível em:

http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4282910/4152311/PMSB_DRENAGEMEMANEJOD EAGUASPLUVIAIS.pdf. Acesso em 11 mai. 2023.

PORTAL INEA.RJ. **Região Hidrográfica 5: Baía de Guanabara; Região Hidrográfica Guandu**. 2020. Disponível em: <http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/GESTAODEAGUAS/InstrumentosdeGestodeRecHid/PlanodeRecursosHidricos/BaiadeGuanabaraAgendaAzul/index.htm>. Acesso em: 7 fev. 2020.

PORTAL RIO.RJ. **Notícias - www.rio.rj.gov.br**. Brasil, 2020. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/web/smac/exibeconteudo?id=5007879>. Acesso em: 24 jul. 2020.

POSTIGO, C.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Fully Automated Determination in the Low Nanogram per Liter Level of Different Classes of Drugs of Abuse in Sewage Water by On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography–Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 9, p. 3123–3134, maio 2008.

PRINZLEVE, M. et al. Cocaine Use in Europe – A Multi-Centre Study: Patterns of Use in Different Groups. **European Addiction Research**, v. 10, n. 4, p. 147–155, 2004.

REPPERT, S. M. et al. Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1003–1015, nov. 1995.

RICHARDSON, G. A. Prenatal Cocaine Exposure: A Longitudinal Study of Development a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 846, n. 1, p. 144–152, 1998.

RICHARDSON, G. A. et al. Adolescent initiation of drug use: effects of prenatal cocaine exposure. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 37–46, 2013.

RICHARDSON, G. A. et al. Effects of prenatal cocaine exposure on adolescent development. **Neurotoxicology and teratology**, v. 49, p. 41–48, jun. 2015.

RIHEL, J.; SCHIER, A. F. Behavioral screening for neuroactive drugs in zebrafish. **Developmental Neurobiology**, p. 13, 2011.

RILEY, E. et al. Prenatal cocaine exposure disrupts the dopaminergic system and its postnatal responses to cocaine. **Genes, Brain and Behavior**, v. 17, n. 4, p. e12436, abr. 2018.

RILEY, E.; KOPOTIYENKO, K.; ZHDANOVA, I. Prenatal and acute cocaine exposure affects neural responses and habituation to visual stimuli. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 9, 25 ago. 2015.

ROVERI, V. et al. Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and cocaine in a beach area of Guarujá, São Paulo State, Brazil, under the influence of urban surface runoff. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 45063–45075, dez. 2020.

ROVERI, V. et al. Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and cocaine

in the urban drainage channels of Santos beaches (São Paulo, Brazil): a neglected, but sensitive issue. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 46, p. 65595–65609, dez. 2021.

SALES JUNIOR, S. F. et al. Long-term landfill leachate exposure modulates antioxidant responses and causes cyto-genotoxic effects in *Eisenia andrei* earthworms. **Environmental Pollution**, v. 287, p. 117351, out. 2021.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: zebrafish. **Revista HCPA**. Vol. 29, n. 2 (2009), p. 100-103, 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. D. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, ago. 2004.

SEYBOLD, V. S. The role of peptides in central sensitization. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 194, p. 451–491, 2009.

SHANG, E. H.; ZHDANOVA, I. V. The Circadian System Is a Target and Modulator of Prenatal Cocaine Effects. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. e587, 11 jul. 2007.

SHIHOMATSU, H. et al. Metodologia para Determinação de Cocaína e Benzoilecgonina em Águas Superficiais. Em: **XIII International Conference on Engineering and Technology Education**. Brasil, 2014. Disponível em: <http://proceedings.copec.org.br/index.php/intertech/article/view/1838>. Acesso em: 7 maio. 2021

SHIHOMATSU, H. M. et al. Guarapiranga Reservoir—Pharmaceuticals and Historical Urban Occupation in a Water Source. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 05, n. 13, p. 1–17, 2017.

SIEGRIST, M.; WIEGAND, T. J. Cocaine. Em: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 999–1002.

SIES, H.; MOSS, K. M. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **The FEBS Journal**, v. 84, n. 2, p. 377–383, 1978.

SILVA, R. F. D. **Determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras de esgoto bruto do distrito federal como suporte à realização de estimativas de consumo**. Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Instituto de Química - Universidade de Brasília. p. 81, 2012.

SNIS - SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO. **Diagnostico dos Serviços de Água e Esgoto 2015**. Brasil, 2015. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2015>. Acesso em: 30 jan. 2017.

SODRÉ, F. et al. Wastewater-Based Epidemiology of Cocaine in the Brazilian Federal District: Spatial Distribution, Weekly Variation and Sample Preservation Strategies. **Journal**

of the **Brazilian Chemical Society**, 2018a.

SODRÉ, F. F. et al. Wastewater-based epidemiology of cocaine in the Brazilian federal district: Spatial distribution, weekly variation and sample preservation strategies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 11, p. 2287–2298, 2018b.

SODRÉ, F. F. et al. Understanding Illicit Drug Use Trends During the Carnival Holiday in the Brazilian Capital Through Wastewater Analysis. **Frontiers in Analytical Science**, v. 2, p. 930480, 23 jun. 2022.

SOS MA - FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Observando os Rios 2019**. O retrato da qualidade da água nas bacias da Mata Atlântica. p. 33, 2019.

SOS MA - FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Observando os Rios 2020**. O retrato da qualidade da água nas bacias da Mata Atlântica. p. 68, 2020.

SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, out. 2018.

STEWART, A. et al. Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. **Rev. Neurosci.**, p. 11, 2011a.

STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Biological Psychiatry**, p. 11, 2011b.

STRUTHERS, J. M.; HANSEN, R. L. Visual recognition memory in drug-exposed infants. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v. 13, n. 2, p. 108–111, 1992.

STYSZKO, K. et al. Occurrence of pharmaceutical residues, personal care products, lifestyle chemicals, illicit drugs and metabolites in wastewater and receiving surface waters of Krakow agglomeration in South Poland. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144360, maio 2021.

SUBEDI, B. et al. Gene alteration in zebrafish exposed to a mixture of substances of abuse. **Environmental Pollution**, v. 278, p. 116777, jun. 2021.

SULEJ-SUCHOMSKA, A. M. et al. Urban wastewater analysis as an effective tool for monitoring illegal drugs, including new psychoactive substances, in the Eastern European region. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020.

THOMAS, K. V. et al. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. **Science of The Total Environment**, v. 432, p. 432–439, ago. 2012.

TRIFILIEFF, P.; MARTINEZ, D. Chapter Five - Cocaine: Mechanism and Effects in the Human Brain. Em: MADRAS, B.; KUHAR, M. (Eds.). **The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System**. Boston: Academic Press, 2014. p. 103–133.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Progress in**

neurobiology, v. 56, n. 6, p. 613–672, 1998.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World drug report 2018**. Global Overview Of Drug Demand And Supply. United Nations publication, Sales No. E.18.XI.9., 2018b.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World drug report 2018**. Analysis of drug markets. United Nations publication, Sales No. E.18.XI.9)., 2018a.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **The world drug report 2011**. United Nations publication. Viena, 2011.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Global report on Cocaine 2023**. Local dynamics, global challenges. United Nations Publications. 2023. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/cocaine/Global_cocaine_report_2023.pdf. Acesso em 17 mai. 2023.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2022**. Global overview of drug demand and drug supply. New York, 2022a. Disponível em: https://www.unodc.org/res/wdr2022/MS/WDR22_Booklet_2.pdf. Acesso em 12 jun. 2023.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2020**. Drug use and Health Consequences. UNITED NATIONS, 2021a.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report 2020**. Drug Supply. UNITED NATIONS, 2021b.

VAN NUIJS, A. L. N. et al. Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment. **Water Research**, v. 43, n. 5, p. 1341–1349, mar. 2009a.

VAN NUIJS, A. L. N. et al. Can cocaine use be evaluated through analysis of wastewater? A nation-wide approach conducted in Belgium. **Addiction**, v. 104, n. 5, p. 734–741, maio 2009b.

VAN NUIJS, A. L. N. et al. Multi-year inter-laboratory exercises for the analysis of illicit drugs and metabolites in wastewater: Development of a quality control system. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 34–43, jun. 2018.

VEROVŠEK, T. et al. Removal of residues of psychoactive substances during wastewater treatment, their occurrence in receiving river waters and environmental risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 866, p. 161257, mar. 2023.

VOLPE, J. J. Effect of cocaine use on the fetus. **The New England journal of medicine**, v. 327, n. 6, p. 399–407, 6 ago. 1992.

WALLACE, L. J. A small dopamine permeability of storage vesicle membranes and end product inhibition of tyrosine hydroxylase are sufficient to explain changes occurring in dopamine synthesis and storage after inhibition of neuron firing. **Synapse**, v. 61, n. 9, p. 715–723, set. 2007.

WATANABE, K. et al. Occurrence of Stimulant Drugs of Abuse in a San Diego, CA, Stream and their Consumption Rates in the Neighboring Community. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 5, p. 202, maio 2020.

WEISS, F. Advances in animal models of relapse for addiction research. **Advances in the Neuroscience of Addiction**, v. 2, 2010.

WILHELM FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, n. 1–4, p. 349–357, fev. 2005.

YAN, S. et al. Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 54–60, dez. 2015.

YANG, A. R. S. T. et al. Deficits in substance P mRNA levels in the CeA are inversely associated with alcohol-motivated responding. **Synapse**, v. 63, n. 11, p. 972–981, nov. 2009.

ZHAO, S.; HUANG, J.; YE, J. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. **Clinical Cancer Research**, p. 9, 2015.

ANEXO I - LICENÇA CEUA FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA ADITIVA

L-001/2023-A1

A Comissão CEUA/IOC, em atenção à solicitação do pesquisador ENRICO MENDES SAGGIORO, responsável pela licença (L-001/2023) do protocolo (CEUA/IOC-035/2022), intitulado, "Avaliação ecotoxicológica de níveis ambientais de contaminantes emergentes em zebrafish (*Danio rerio*)", que atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), autoriza o presente aditivo. A referida licença aditiva não exime a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença aditiva somente altera a validade da licença de 31/05/2023 para 31/05/2024.

Observações:

- Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 5 de abril de 2023

Tânia Zaverucha do Valle
Matrícula SIAPE 1362665
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO II

Documentação experimental – Dados pluviométricos e resultados físico-químicos das oito campanhas realizadas em água de rio

Dados pluviométricos e resultados físico-químicos das oito campanhas realizadas em água de rio

Dados pluviométricos (mm m⁻²): 24h até coleta – AleraRio (2023)

Identificação	mai/22	jul/22	ago/22	set/22	out/22	nov/22	dez/22	jan/23
Canal do Cunha	1	0,0	DA	0,0	0,0	18,0	0,2	0,0
Canal do Manguê	7,4	0,0	DA	0,8	0,0	4,4	1,8	0,0
Rio Carioca	9,8	0,0	DA	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0
Rio Irajá	9,2	0,0	DA	0,0	0,0	6,6	0,0	0,0
Rio Meriti	22,4	0,0	DA	0,0	0,4	4,2	0,0	0,0

Dados pluviométricos (mm m⁻²): 96h anteriores à coleta – AleraRio (2023)

Identificação	mai/22	jul/22	ago/22	set/22	out/22	nov/22	dez/22	jan/23
Canal do Cunha	1	0,0	DA	21,8	5,4	18,8	8,8	1,0
Canal do Manguê	7,4	0,0	DA	27,4	0,4	7,0	51,8	1,4
Rio Carioca	10	0,0	DA	53,8	0,4	4,4	61,4	1,0
Rio Irajá	9,2	0,0	DA	37,2	1,0	7,8	6,4	2,4
Rio Meriti	22,4	0,0	DA	39,4	5,6	4,8	4,0	8,0

Legenda: DA - Dados ausentes no banco do Sistema AlertaRio.

Obs.: Durante a coleta de agosto/2022, os dados climáticos anotados em campo foram: C. do Cunha (Sol), C. do Manguê (Sol), Rio Carioca (Nublado), Rio Irajá (Sol) e Rio Meriti (Nublado).

Dados pluviométricos referentes a cada campanha de monitoramento conforme últimas 24 e 96 h prévias ao momento da coleta. Fonte: ALERTA RIO (2023).

Dados pluviométricos e resultados físico-químicos das oito campanhas realizadas em água de rio

Data da Coleta	Identificação	Hora da coleta	Cond. Climática	T (°C)	pH	Condutiv. ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	Salinidade (PSU)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-Total (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)
12/05/2022	C. do Cunha	8:56	Nublado	24,70	6,8	732	0,35	-	-	-
	C. do Manguê	10:00	Nublado	24,60	7	843	0,40	-	-	-
	Rio Carioca	11:03	Chuva	25,00	7,2	283	0,13	-	-	-
	Rio Irajá	11:42	Nublado	24,90	7	542	0,26	-	-	-
	Rio Meriti	12:04	Nublado	24,60	7,2	904	0,44	-	-	-
11/07/2022	C. do Cunha	9:06	Sol	24,58	6,94	437	0,21	12,3	26,10	110,01
	C. do Manguê	9:57	Sol	23,34	7,21	1595	0,80	13,9	49,50	52,94
	Rio Carioca	10:35	Sol	22,66	7,02	274	0,13	3,82	15,80	280,67
	Rio Irajá	11:25	Sol	24,63	7,23	9154	5,12	13,7	18,80	21,23
	Rio Meriti	11:40	Sol	26,78	7,23	6283	3,24	16,82	26,30	439,80
22/08/2022	C. do Cunha	8:53	Sol	19,39	6,86	695	0,33	28,57	18,22	44,62
	C. do Manguê	9:47	Sol	19,00	7,01	1430	0,69	20,07	17,60	61,00
	Rio Carioca	10:30	Nublado	20,30	7,00	3555	1,88	12,10	12,56	123,19
	Rio Irajá	11:37	Sol	20,30	7,00	5202	2,38	29,45	21,40	139,88
	Rio Meriti	12:05	Nublado	21,17	7,09	7236	4,00	33,74	18,14	304,92
19/09/2022	C. do Cunha	9:06	Sol	18,55	7,09	392	0,19	20,26	14,60	98,56
	C. do Manguê	9:57	Sol	19,42	7,12	1700	0,50	17,23	14,00	110,21
	Rio Carioca	10:35	Sol	20,28	7,25	2453	1,26	15,37	10,80	116,62
	Rio Irajá	11:25	Sol	20,83	7,02	13,24	8,75	21,78	13,60	571,26
	Rio Meriti	11:40	Sol	21,52	7,12	5290	3,10	25,33	17,80	227,37

Obs.: Os parâmetros N-NH₃, N-Total e DQO passaram a ser monitorados a partir da segunda campanha de monitoramento, pela parceria com o LABIFI (UERJ).

Resultados físico-químicos das campanhas na estação seca.

Dados pluviométricos e resultados físico-químicos das oito campanhas realizadas em água de rio

Data da Coleta	Identificação	Hora da coleta	Cond. Climática	T (°C)	pH	Condutiv. ($\mu\text{s cm}^{-1}$)	Salinidade (PSU)	N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	N-Total (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)
24/10/2022	C. do Cunha	8:40	Sol	22,60	7,04	600	0,29	6,74	41,60	56,43
	C. do Manguê	9:30	Sol	23,24	7,17	4500	2,40	12,79	21,00	82,34
	Rio Carioca	10:13	Sol	22,12	7,4	38,6	24,78	0,89	3,46	744,22
	Rio Irajá	11:00	Sol	25,68	7,13	13,28	7,64	7,69	16,78	723,42
	Rio Meriti	11:30	Sol	26,46	7,13	5000	2,77	9,97	21,80	203,06
16/11/2022	C. do Cunha	9:10	Chuva	22,29	7,06	427	0,22	18,90	17,94	110,21
	C. do Manguê	10:00	Chuva	22,60	7,27	2231	1,14	17,15	17,30	130,37
	Rio Carioca	10:43	Chuva	22,59	7,34	5174	2,79	6,49	7,71	154,17
	Rio Irajá	11:32	Chuva	21,74	7,51	131	0,06	0,73	3,90	72,13
	Rio Meriti	11:47	Chuva	23,10	7,17	5501	2,97	16,76	16,34	200,37
19/12/2022	C. do Cunha	9:10	Nublado	23,72	7,09	474	0,23	19,48	18,78	67,90
	C. do Manguê	10:00	Nublado	22,88	7,05	2689	1,39	7,19	11,36	84,59
	Rio Carioca	10:43	Nublado	22,67	7,19	503	0,24	12,42	11,74	61,63
	Rio Irajá	11:32	Nublado	23,63	7,08	3659	3,65	26,28	21,60	172,85
	Rio Meriti	11:47	Nublado	23,45	7,17	6896	3,78	23,95	19,06	172,85
17/01/2023	C. do Cunha	9:10	Sol	27,87	6,78	375	0,17	15,10	19,74	120,97
	C. do Manguê	10:00	Sol	27,31	6,91	498	0,23	8,80	15,16	98,90
	Rio Carioca	10:43	Sol	28,22	6,98	364	0,17	8,90	12,36	67,90
	Rio Irajá	11:32	Sol	29,66	6,96	1782	0,89	15,60	22,00	123,35
	Rio Meriti	11:47	Sol	32,02	7,03	1674	0,83	13,60	22,20	109,64

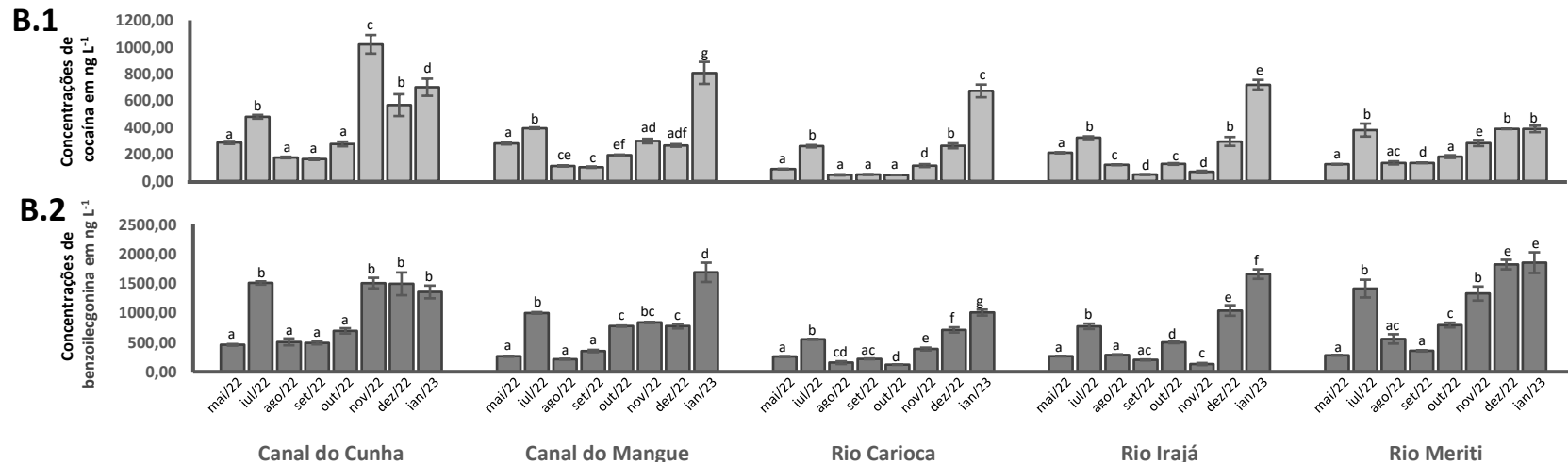
Resultados físico-químicos das campanhas na estação chuvosa.

ANEXO III

Documentação experimental – Resultados detalhados das concentrações de COC e BE nas campanhas de monitoramento

Resultados detalhados das concentrações de COC e BE nas campanhas de monitoramento

A.		Estação seca				Estação chuvosa			
		mai/22	jul/22	ago/22	set/22	out/22	nov/22	dez/22	jan/23
COC (ng L ⁻¹)	C. do Cunha	287,49 ±10,95	479,45 ±13,82	175,61 ±5,43	163,09 ±6,56	276,60 ±17,56	1020,83 ±69,50	566,32 ±81,51	699,97 ±63,97
	C. do Manguê	281,02 ±7,91	394,46 ±5,71	112,22 ±4,27	103,12 ±4,98	192,65 ±4,40	298,33 ±16,71	265,48 ±9,62	807,05 ±82,38
	Rio Carioca	89,24 ±1,90	259,53 ±8,66	45,69 ±4,00	48,33 ±2,28	43,94 ±0,49	114,67 ±10,69	262,63 ±18,34	672,54 ±47,35
	Rio Irajá	210,36 ±4,08	322,96 ±10,14	120,76 ±2,78	48,24 ±1,06	126,79 ±5,93	69,17 ±7,28	295,28 ±33,24	718,74 ±36,11
	Rio Meriti	125,07 ±1,44	380,37 ±48,37	134,97 ±11,55	134,97 ±1,67	181,80 ±10,02	283,35 ±22,62	388,84 ±1,41	388,57 ±23,97
BE (ng L ⁻¹)	C. do Cunha	455,90 ±13,87	1505,63 ±27,50	506,41 ±58,17	488,65 ±24,46	693,81 ±44,04	1503,78 ±90,09	1491,14 ±193,39	1353,22 ±108,00
	C. do Manguê	262,46 ±6,76	998,49 ±13,33	212,73 ±2,67	351,70 ±19,88	774,27 ±9,20	836,59 ±9,02	773,59 ±39,06	1686,95 ±163,68
	Rio Carioca	257,09 ±6,48	550,71 ±6,34	154,25 ±23,46	218,42 ±6,22	120,03 ±3,57	385,19 ±23,86	709,24 ±44,26	1003,78 ±50,32
	Rio Irajá	265,19 ±4,20	771,12 ±45,74	286,17 ±8,71	200,50 ±7,83	498,40 ±14,09	130,90 ±17,58	1039,07 ±89,27	1655,70 ±80,73
	Rio Meriti	278,85 ±4,34	1410,29 ±150,93	557,06 ±79,42	354,34 ±11,34	792,14 ±40,14	1326,56 ±119,41	1818,24 ±81,29	1850,51 ±175,33



Obs.: A = média ± dp das concentrações de cocaína e benzoilecgonina nos pontos de coleta (N = 3); B.1 e B.2 = Concentrações de cocaína e benzoilecgonina nos pontos de coleta (N = 3). Letras diferentes acima das barras indicam significância estatística entre níveis de cocaína ou benzoilecgonina para um mesmo ponto de coleta ($p < 0,05$).

Resultados detalhados do monitoramento de COC e BE durante as 8 campanhas.

Resultados detalhados das concentrações de COC e BE nas campanhas de monitoramento

COC/BE								
	Estação seca				Estação chuvosa			
	mai/22	jul/22	ago/22	set/22	out/22	nov/22	dez/22	jan/23
C. do Cunha	0,63	0,32	0,35	0,33	0,40	0,68	0,38	0,52
C. do Manguê	1,07	0,40	0,53	0,29	0,25	0,36	0,34	0,48
Rio Carioca	0,35	0,47	0,30	0,22	0,37	0,30	0,37	0,67
Rio Irajá	0,79	0,42	0,42	0,24	0,25	0,53	0,28	0,43
Rio Meriti	0,45	0,27	0,24	0,38	0,23	0,21	0,21	0,21

Resultados detalhados da razão entre COC e BE durante as 8 campanhas.

ANEXO IV

Documentação experimental – Resultados do FET Test para exposições à COC e BE.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total	
CTL meio emb.	Atraso na formação	0	0	0	2	2	4	
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0		
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	1	1		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	1	1		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0		
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0		
Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0			
CTL meio emb.	Atraso na formação	0	0	0	1	1	5	
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0		
	Edema no saco vitelínico	0	1	0	0	1		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0		
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	1		3
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0		
Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0			
CTL MeOH	Atraso na formação	0	0	0	0	0	5	
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0		
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0		
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5		
Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0			
CTL MeOH	Atraso na formação	0	0	0	0	0	13	
	Edema no pericárdio	0	1	1	1	3		
	Edema no saco vitelínico	0	2	2	1	5		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0		
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5		
Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0			

FET Test: *Scores* observados nos controles meio embrionico e MeOH.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total
COC 50 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	2	2	8
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	1	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 50 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	4
	Edema no pericárdio	0	1	2	0	3	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	1	1	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 500 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	5
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 500 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	3
	Edema no pericárdio	0	1	1	0	2	
	Edema no saco vitelínico	0	0	1	0	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	

FET Test: *Scores* observados nas exposições à 50 e 500 ng L⁻¹ de COC.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total
COC 1000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	2	2	13
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	1	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	2	-	-	-	10	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 1000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	11
	Edema no pericárdio	0	1	2	1	4	
	Edema no saco vitelínico	0	4	1	1	6	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	1	1	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 2000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	5	5	6
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	1	1	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
COC 2000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	31
	Edema no pericárdio	0	5	5	2	12	
	Edema no saco vitelínico	0	7	5	3	15	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	4	4	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	

FET Test: Scores observados nas exposições à 1000 e 2000 ng L⁻¹ de COC.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total	
COC 3000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	1	1	1	
	Edema no pericárdio	0	0	0	0	0		
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0		
Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	0		
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0		
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0		
COC 3000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	14	
	Edema no pericárdio	0	3	0	0	3		
	Edema no saco vitelínico	0	5	0	0	5		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	6	6		
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
		Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-		0
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0		
COC 5000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	2	2	7	
	Edema no pericárdio	0	0	0	1	1		
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	3	3		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	1	1		
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
		Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-		0
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0		
COC 5000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	14	
	Edema no pericárdio	0	5	0	0	5		
	Edema no saco vitelínico	0	2	0	0	2		
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0		
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	7	7		
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0		0
		Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-		0
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0		

FET Test: Scores observados nas exposições à 3000 e 5000 ng L⁻¹ de COC.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total
BE 50 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	1	0	0	1	2	27
	Edema no pericárdio	0	0	1	1	2	
	Edema no saco vitelínico	0	0	2	0	2	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	1	1	
	Casos de morte antes de 24h	3	-	-	-	15	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 50 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	22
	Edema no pericárdio	0	0	0	1	1	
	Edema no saco vitelínico	0	1	0	0	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	4	-	-	-	20	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 500 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	1	3	4	17
	Edema no pericárdio	0	0	3	0	3	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	2	-	-	-	10	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 500 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	4	4	9
	Edema no pericárdio	0	0	0	2	2	
	Edema no saco vitelínico	0	1	1	1	3	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	

FET Test: *Scores* observados nas exposições à 50 e 500 ng L⁻¹ de BE.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total
BE 1000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	2	2	25
	Edema no pericárdio	0	0	3	0	3	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	1	20	
BE 1000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	1	1	11
	Edema no pericárdio	0	2	1	0	3	
	Edema no saco vitelínico	0	1	0	1	2	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 2000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	18
	Edema no pericárdio	0	1	4	0	5	
	Edema no saco vitelínico	0	1	0	0	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	1	0	1	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	1	1	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 2000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	3	3	39
	Edema no pericárdio	0	0	0	1	1	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	1	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	1	1	1	
	Casos de morte antes de 24h	3	-	-	-	15	
	Casos de morte/dia após 24h	-	1	0	0	10	

FET Test: *Scores* observados nas exposições à 1000 e 2000 ng L⁻¹ de BE.

Resultados do FET Test para exposições à COC e BE

Exposição	Endpoints	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	Score	Total
BE 3000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	24
	Edema no pericárdio	0	0	1	1	2	
	Edema no saco vitelínico	0	0	2	0	2	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	0	-	-	-	0	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	1	20	
BE 3000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	4	4	16
	Edema no pericárdio	0	1	0	0	1	
	Edema no saco vitelínico	0	0	1	0	1	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	2	-	-	-	10	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	
BE 5000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	0	0	37
	Edema no pericárdio	0	1	0	1	2	
	Edema no saco vitelínico	0	0	0	0	0	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	1	1	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 1	Deformação generalizada	0	1	1	1	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	1	20	
BE 5000 (ng L ⁻¹)	Atraso na formação	0	0	0	7	7	18
	Edema no pericárdio	0	0	4	0	4	
	Edema no saco vitelínico	0	0	1	1	2	
	Malformação da cauda/vértebra	0	0	0	0	0	
	Baixa resposta ao toque	0	0	0	0	0	
	Repl. 2	Deformação generalizada	0	0	0	0	
	Casos de morte antes de 24h	1	-	-	-	5	
	Casos de morte/dia após 24h	-	0	0	0	0	

FET Test: *Scores* observados nas exposições à 3000 e 5000 ng L⁻¹ de BE.

ANEXO V

Resultados da Análise de Componentes Principais dos biomarcadores do ensaio crônico em
cérebro e fígado dos peixes

Resultados da Análise de Componentes Principais dos biomarcadores do ensaio crônico em cérebro e fígado dos peixes

A.	SOD_CER_COC	SOD_CER_BE	SOD_CER_MIX	GST_CER_COC	GST_CER_BE	GST_CER_MIX	GSH_CER_COC	GSH_CER_MIX	MDA_CER_MIX	PC_CER_COC	PC_CER_BE	PC_CER_MIX
SOD_CER_COC	1.00											
SOD_CER_BE	0.71	1.00										
SOD_CER_MIX	0.63	0.89	1.00									
GST_CER_COC	0.58	0.8*0	0.76	1.00								
GST_CER_BE	0.66	0.68	0.49	0.64	1.00							
GST_CER_MIX	0.26*	0.17	0.10	0.41	0.13	1.00						
GSH_CER_COC	-0.32	0.04	0.06*	0.14*	-0.08	-0.25	1.00					
GSH_CER_MIX	-0.55	-0.68	-0.44*	-0.45	-0.76*	0.13*	0.00	1.00				
MDA_CER_MIX	-0.56	-0.59	-0.60	-0.55	-0.61	-0.26*	0.17	0.49*	1.00			
PC_CER_COC	0.76	0.74	0.82	0.74	0.60	0.30	-0.10	-0.35*	-0.62	1.00		
PC_CER_BE	0.73	0.63*	0.57*	0.56*	0.72	0.31	-0.48*	-0.57	-0.71	0.73	1.00	
PC_CER_MIX	0.50	0.69	0.68	0.87*	0.63	0.40	0.23*	-0.41	-0.56	0.74	0.61	1.00

B.	SOD_FIG_COC	SOD_FIG_BE	CAT_FIG_COC	GST_FIG_BE	GST_FIG_MIX	GSH_FIG_COC	GSH_FIG_BE	GSH_FIG_MIX	MDA_FIG_COC	MDA_FIG_BE	MDA_FIG_MIX	PC_FIG_COC	PC_FIG_BE
SOD_FIG_COC	1.00												
SOD_FIG_BE	0.52	1.00											
CAT_FIG_COC	0.09	0.35*	1.00										
GST_FIG_BE	-0.31	-0.30	0.07	1.00									
GST_FIG_MIX	0.34	0.49	0.68*	0.07	1.00								
GSH_FIG_COC	-0.20	-0.12	0.53*	0.56*	0.46*	1.00							
GSH_FIG_BE	-0.30	-0.39	0.01	0.65*	0.06	0.77*	1.00						
GSH_FIG_MIX	0.24	0.44	0.78*	0.06	0.82*	0.55*	0.00	1.00					
MDA_FIG_COC	0.29	0.35	0.04	-0.43*	-0.02	-0.47*	-0.66*	-0.05	1.00				
MDA_FIG_BE	-0.08	-0.18	-0.50*	0.06	-0.50*	-0.23	0.16	-0.70*	0.21	1.00			
MDA_FIG_MIX	0.27	0.16	-0.33*	0.03	-0.19*	-0.21	0.03	-0.39*	0.49	0.78*	1.00		
PC_FIG_COC	0.54	0.84	0.38	-0.14	0.62	0.00	-0.29*	0.57*	0.31	-0.28*	0.08*	1.00	
PC_FIG_BE	0.55	0.70	0.07	0.05*	0.40	0.03	0.06*	0.20	0.00*	0.16*	0.45	0.63	1.00

Análise de Componentes Principais dos biomarcadores do ensaio crônico em cérebro (A) e fígado (B) dos peixes adultos expostos. Um * foi utilizado para demonstrar significância entre comparações ($p < 0,05$).

ANEXO VI

Documentação experimental – Cromatogramas

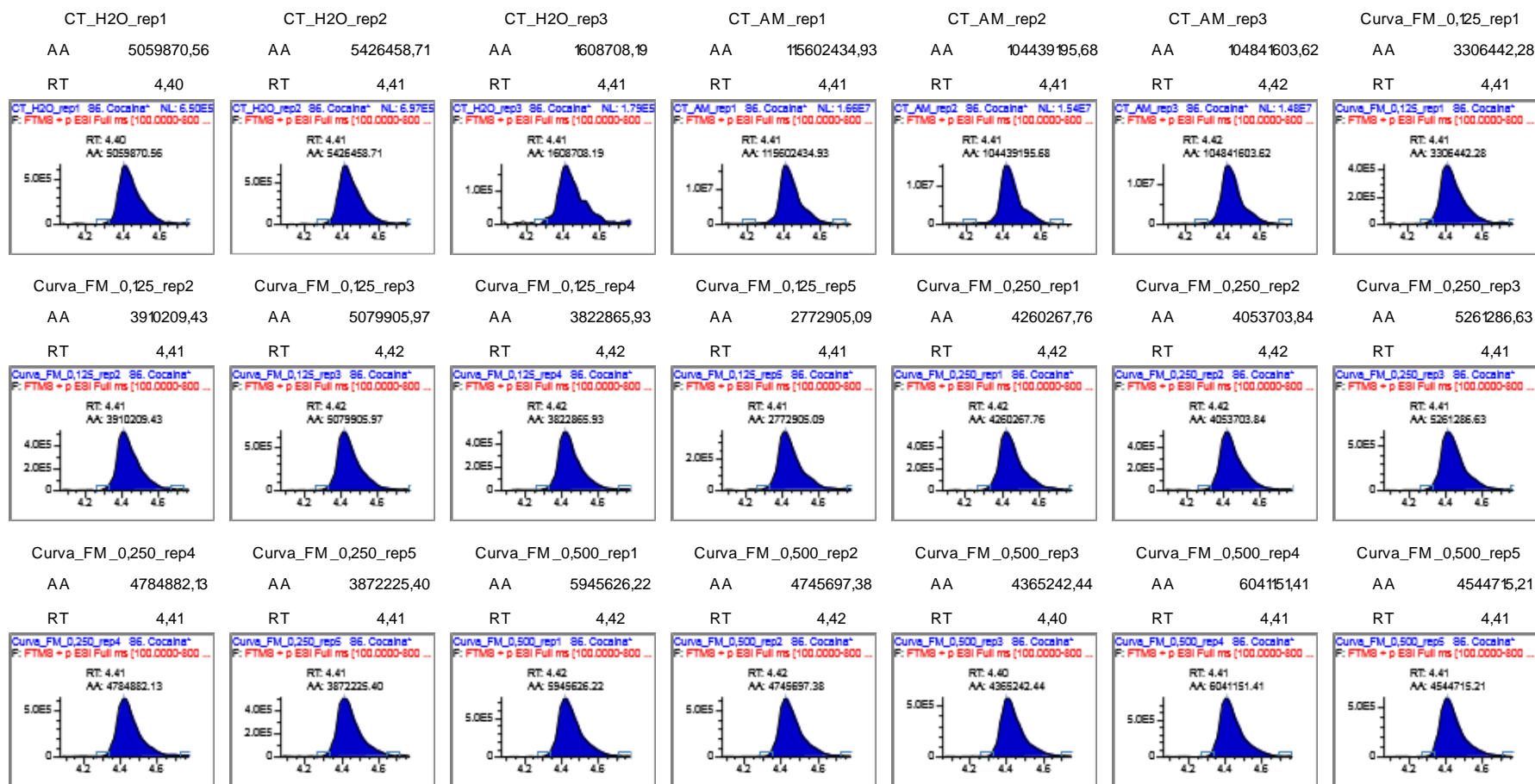
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

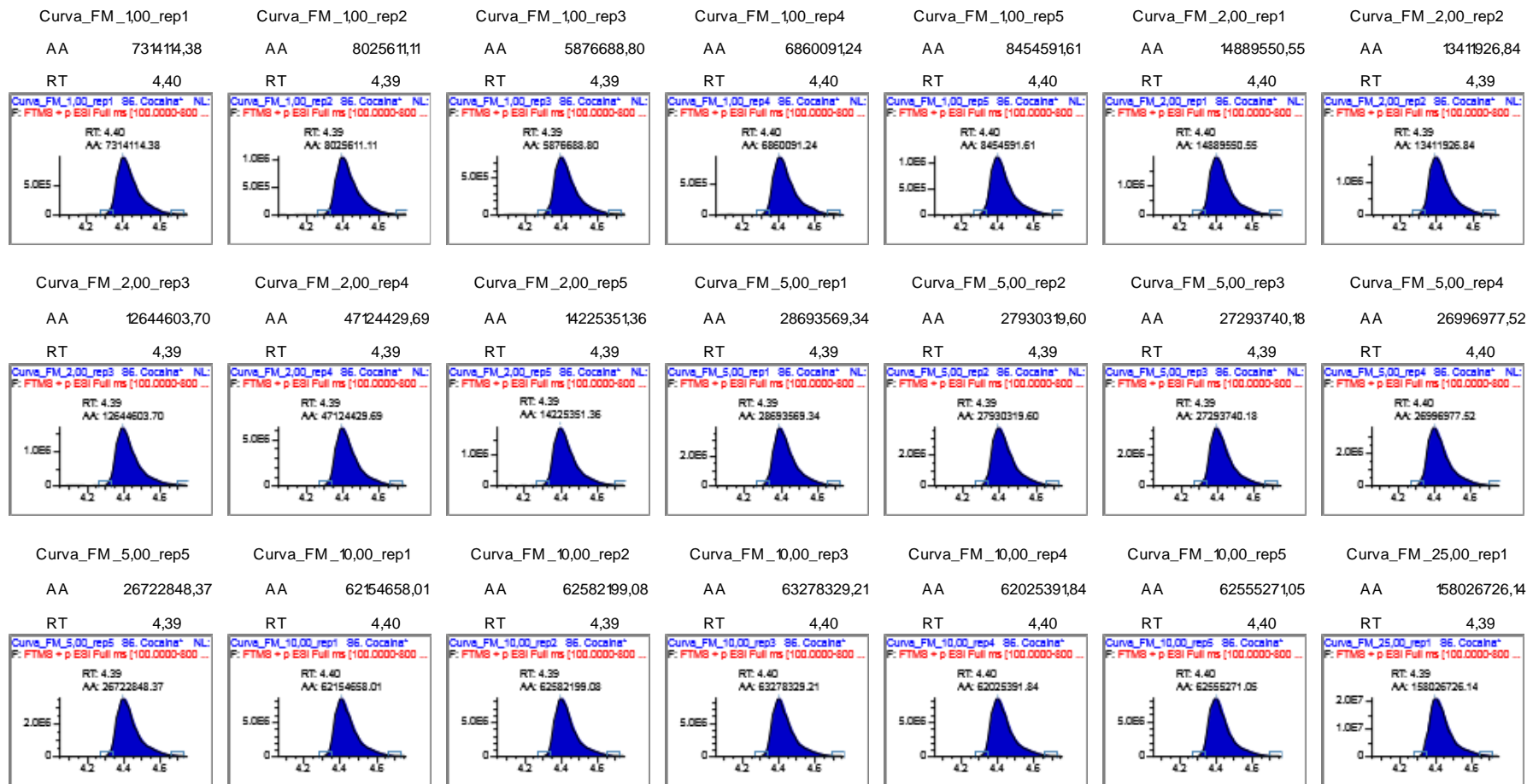
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220207_validacao.2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVILi_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao\2\20220207_validacao.2.3

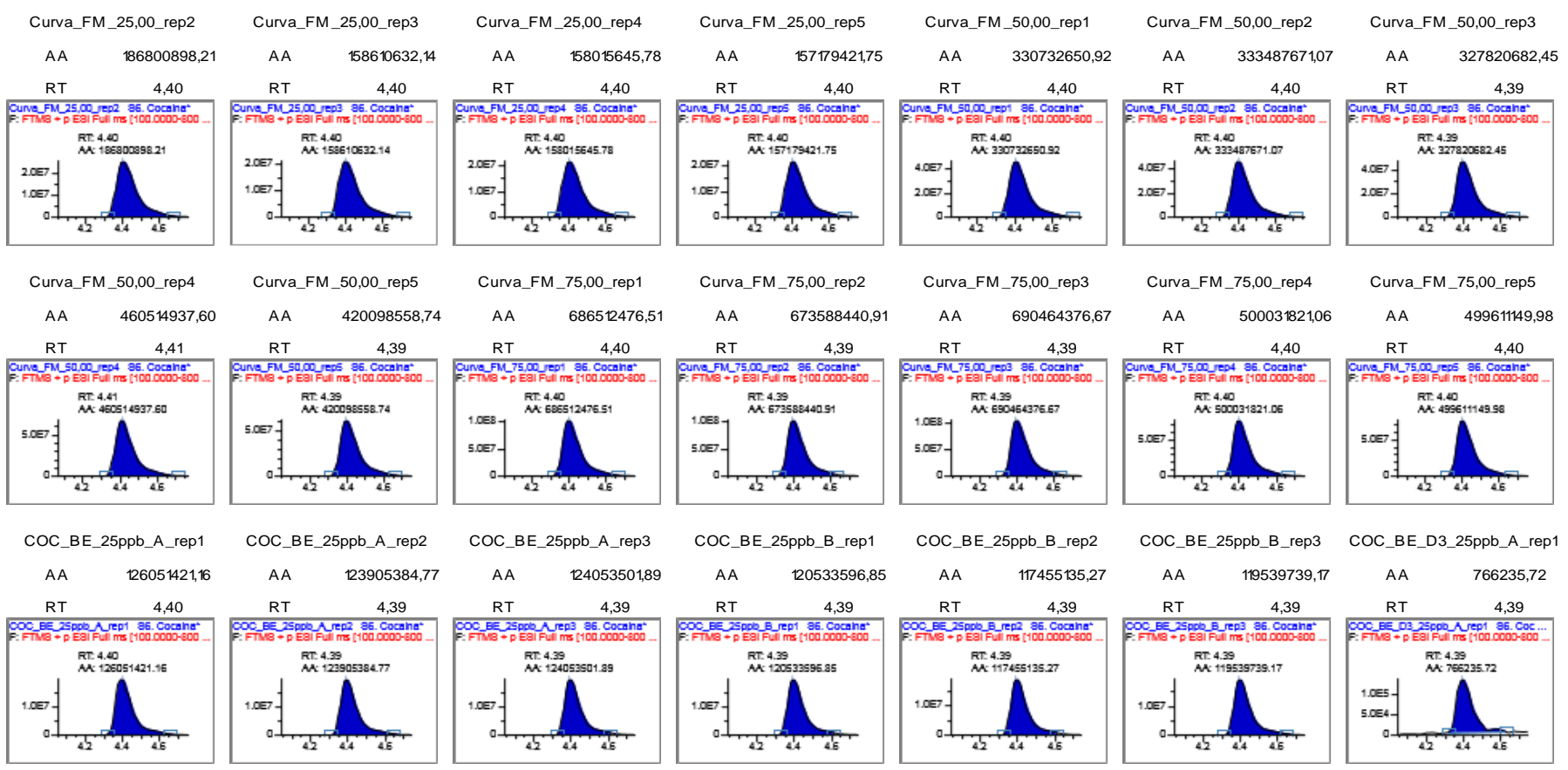


Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

ANEXO VI
Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao 2\20220207_validacao2.3



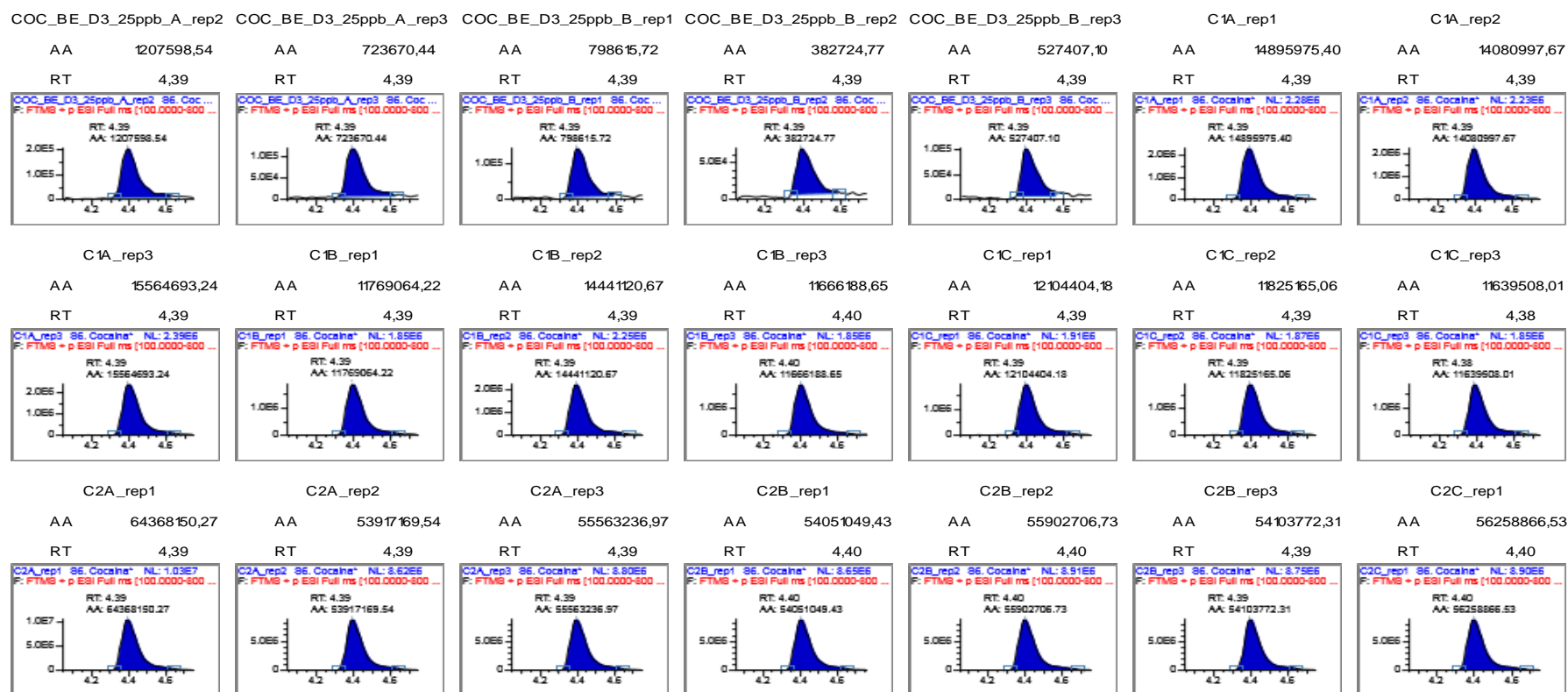
Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

ANEXO VI
Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina 1_GABRIEL
 m/z 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3

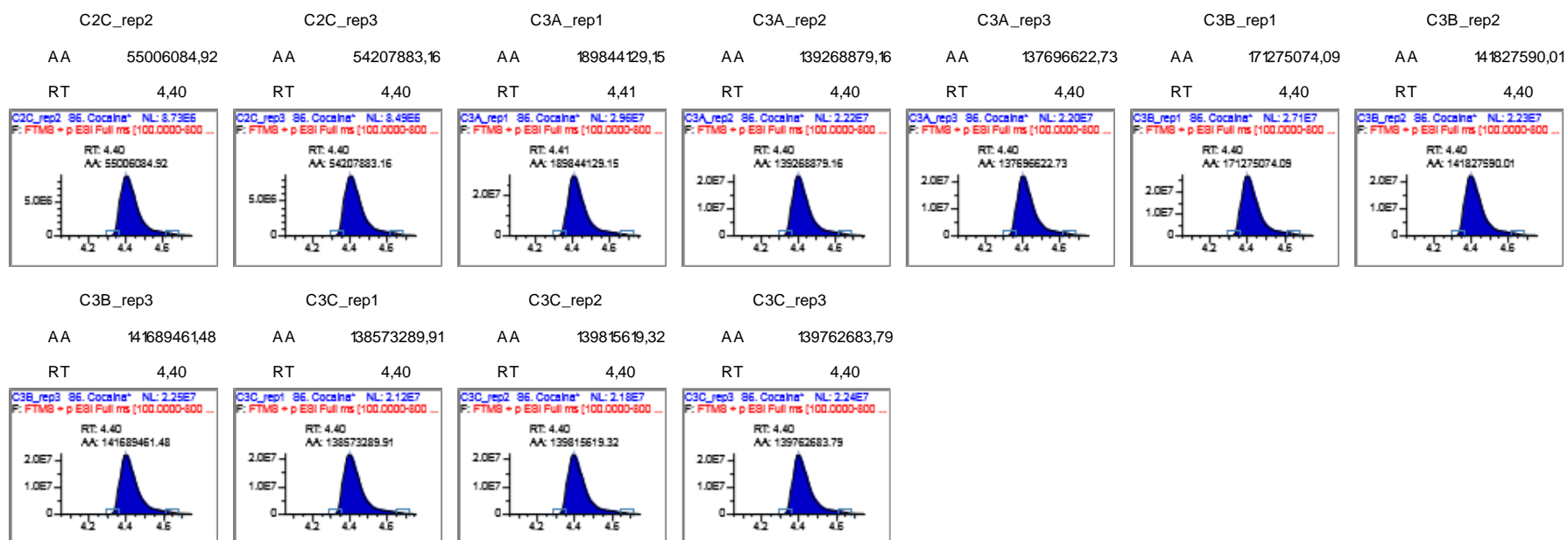


Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina 1_GABRIEL
 m/z 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.

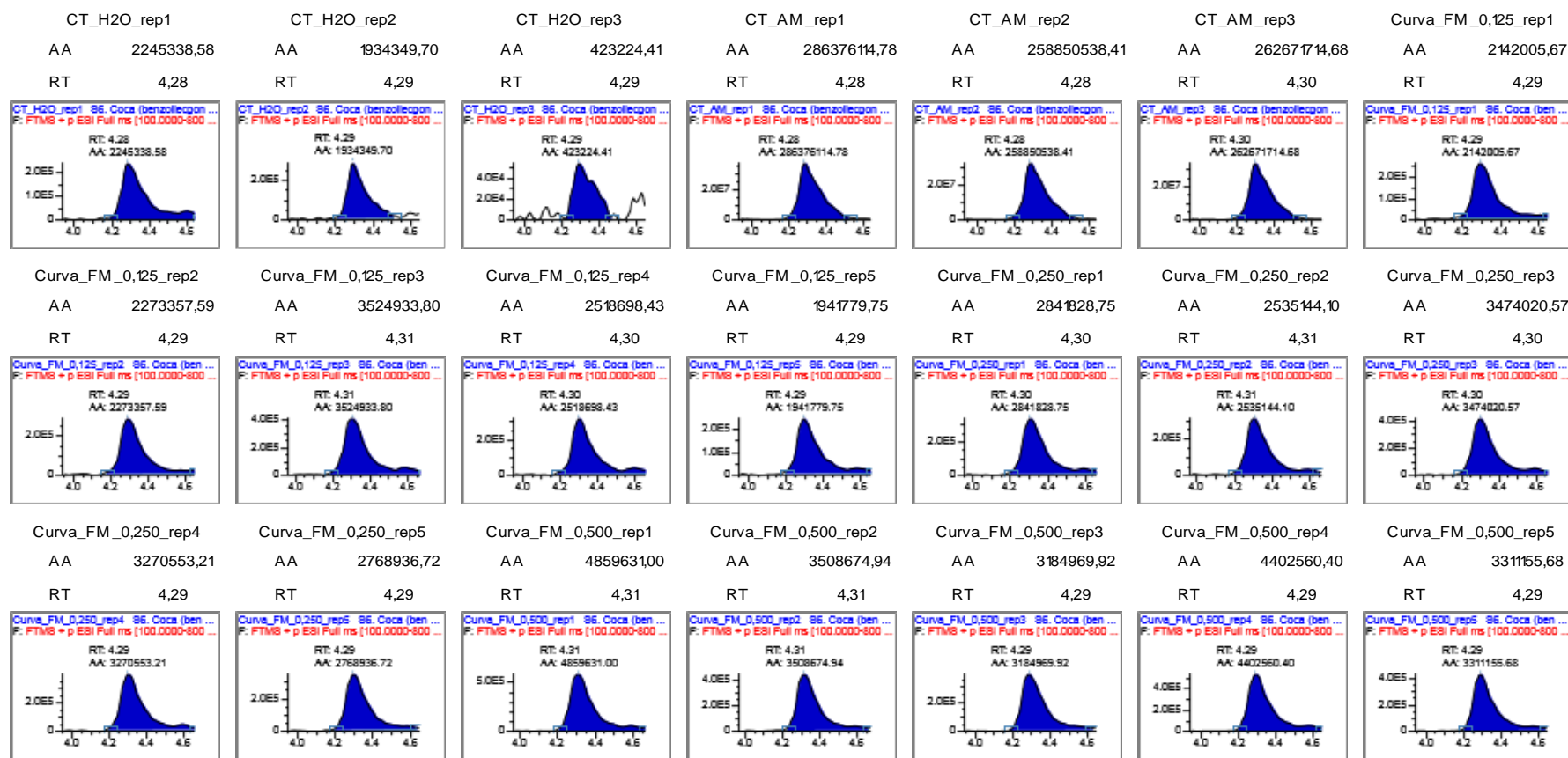
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

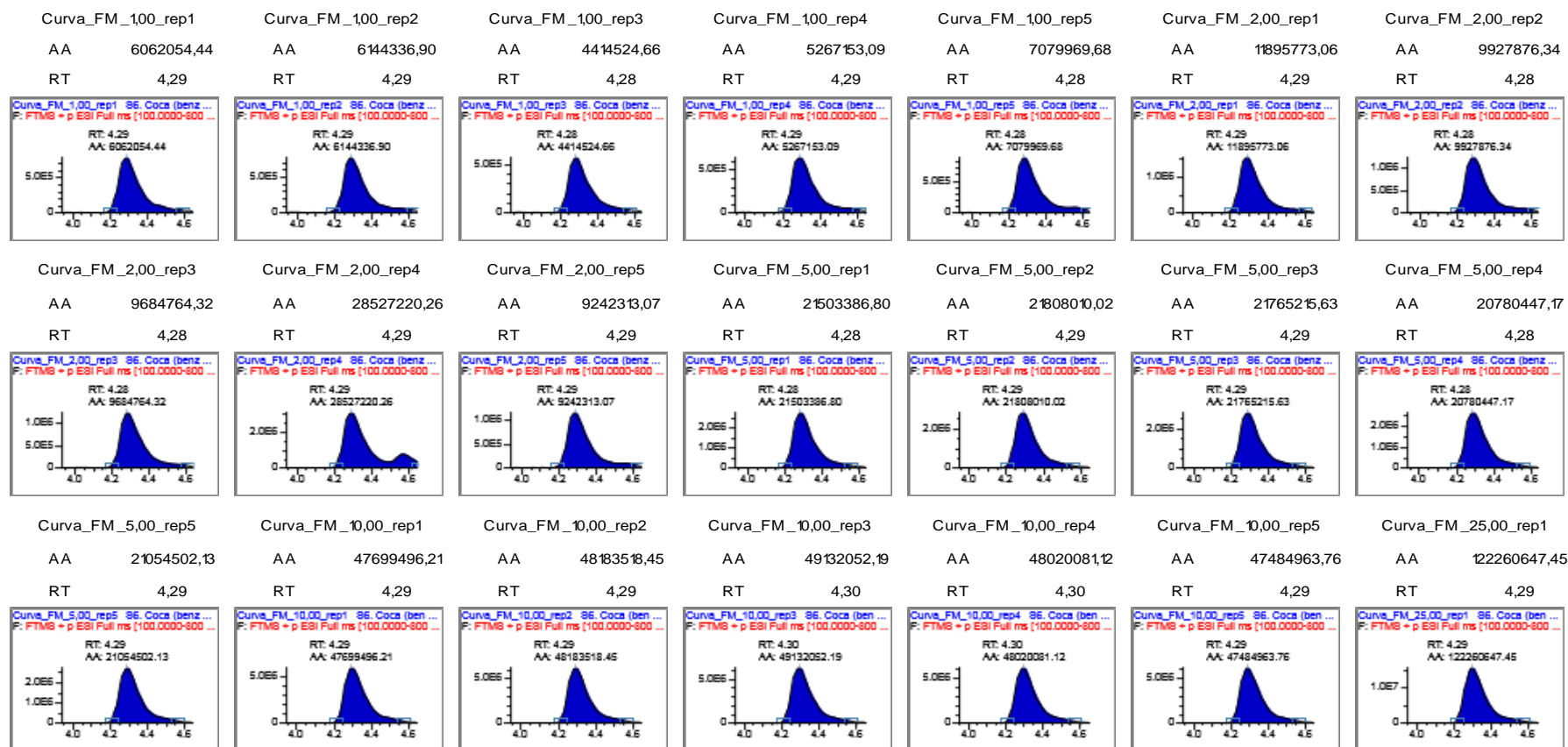
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao\2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

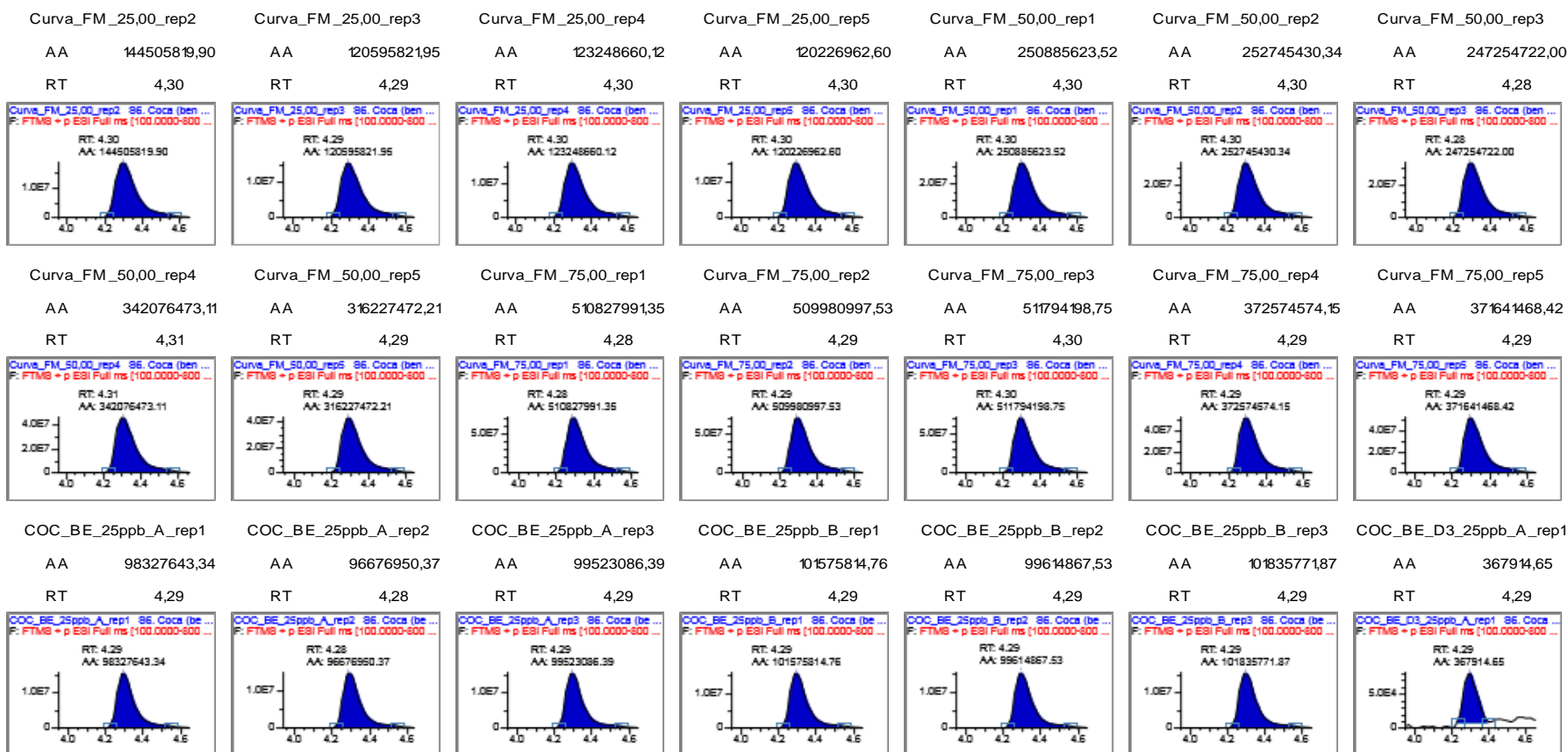
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

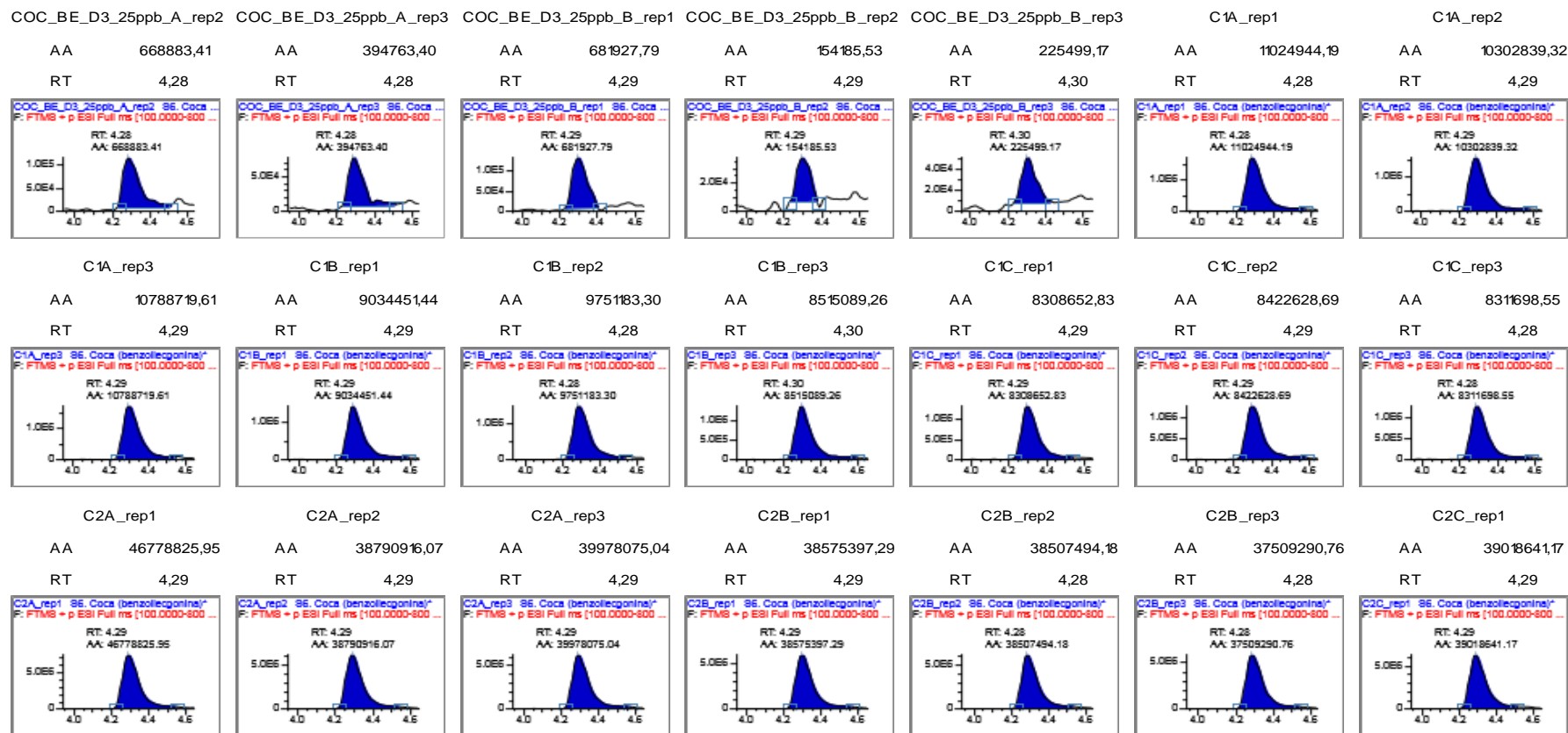
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



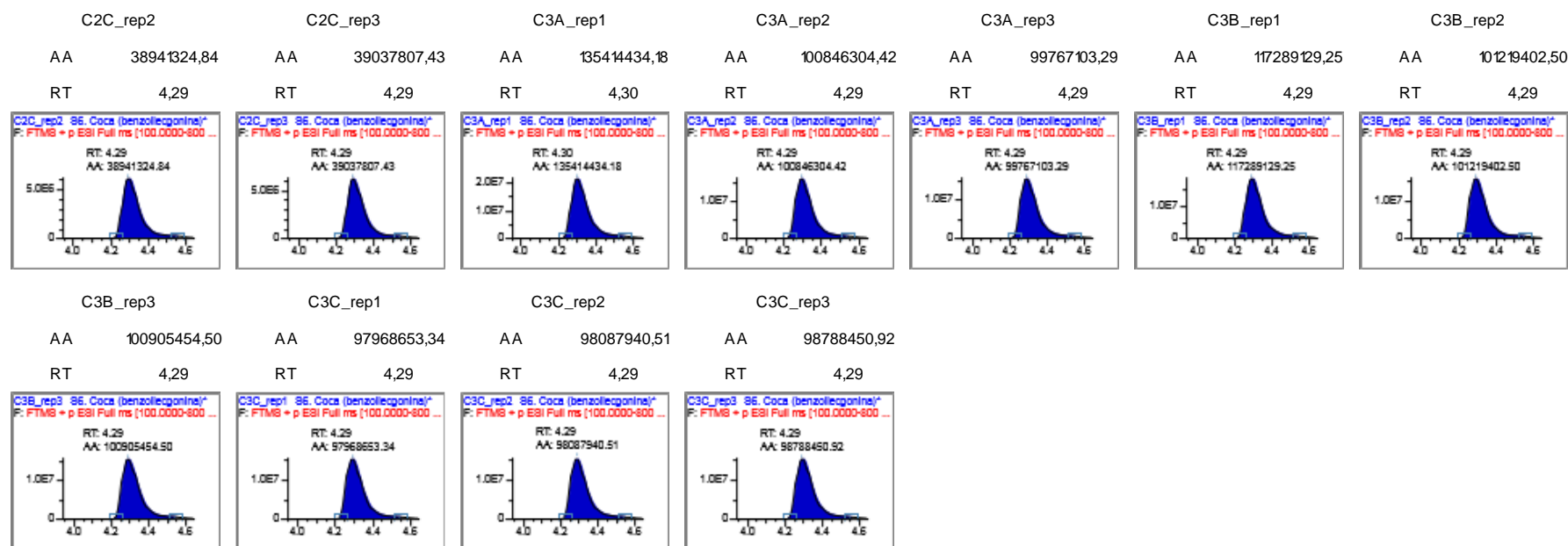
Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method TVIL_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.

ANEXO VI
Cromatogramas

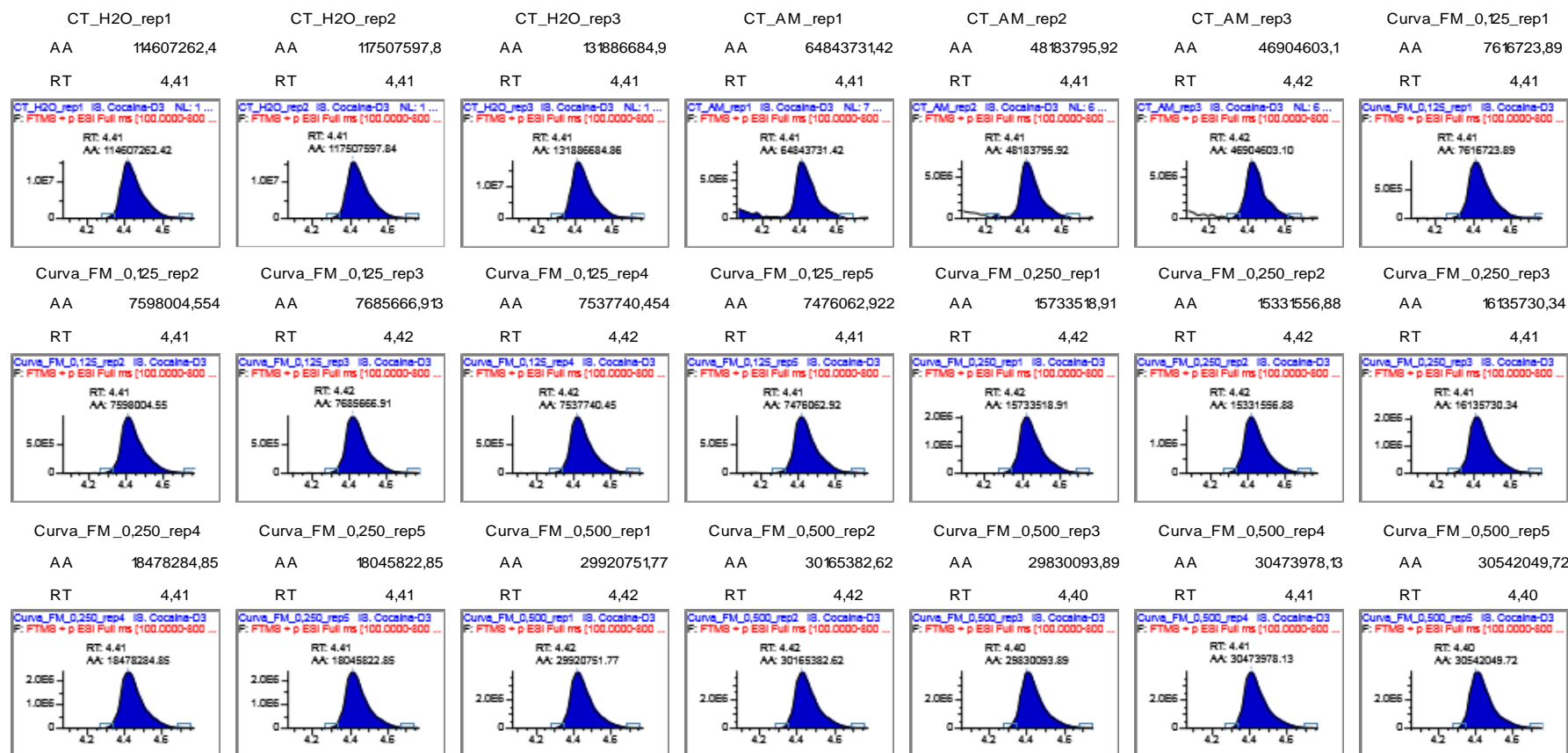


Compound: S6. Cocaina-D3*
m/z: 307,17316
Lot number:
Instrument Method: TVIL_i_GABRIEL
Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3

Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL



LC-HRMS - ORBITRAP analyses



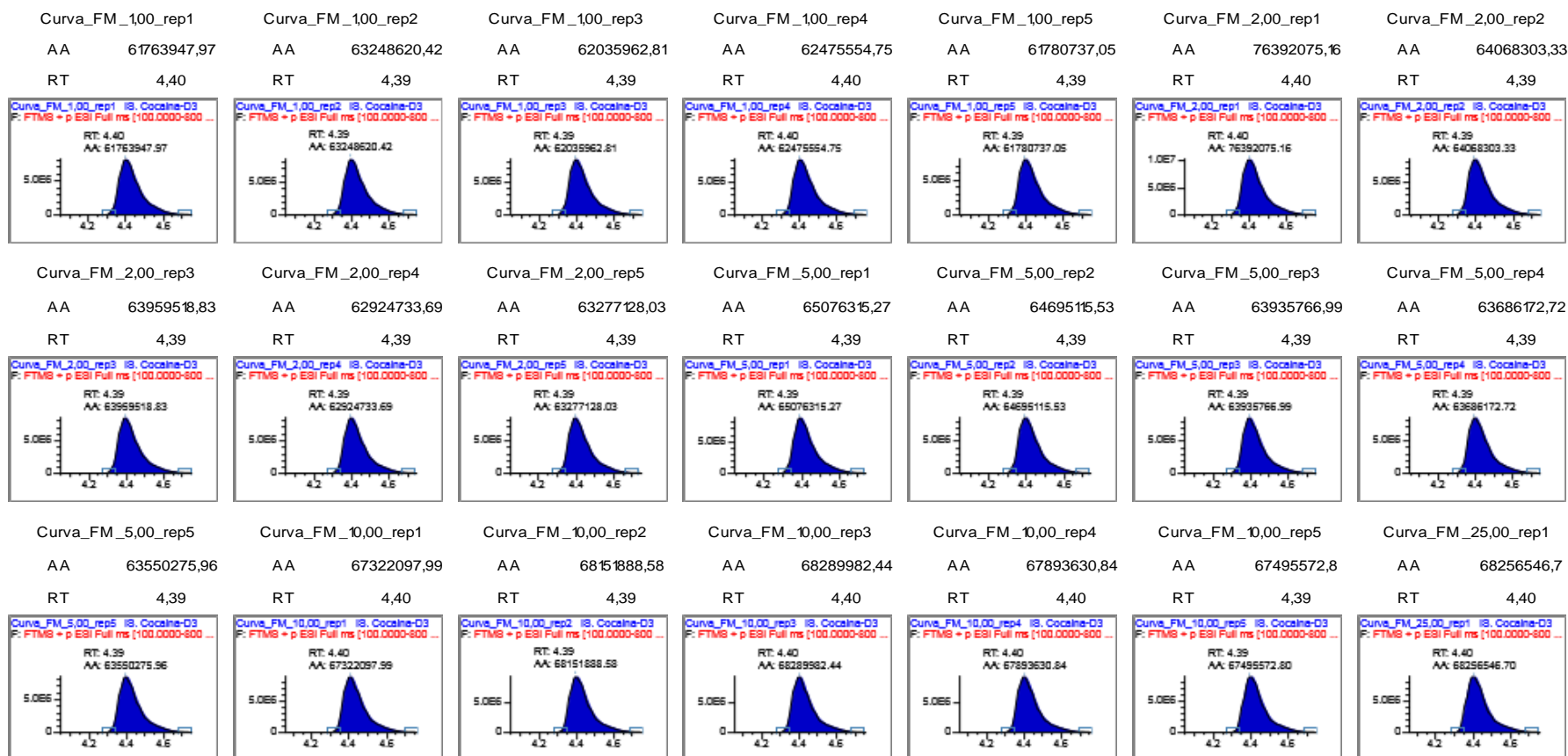
Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

ANEXO VI
Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method TVIL_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

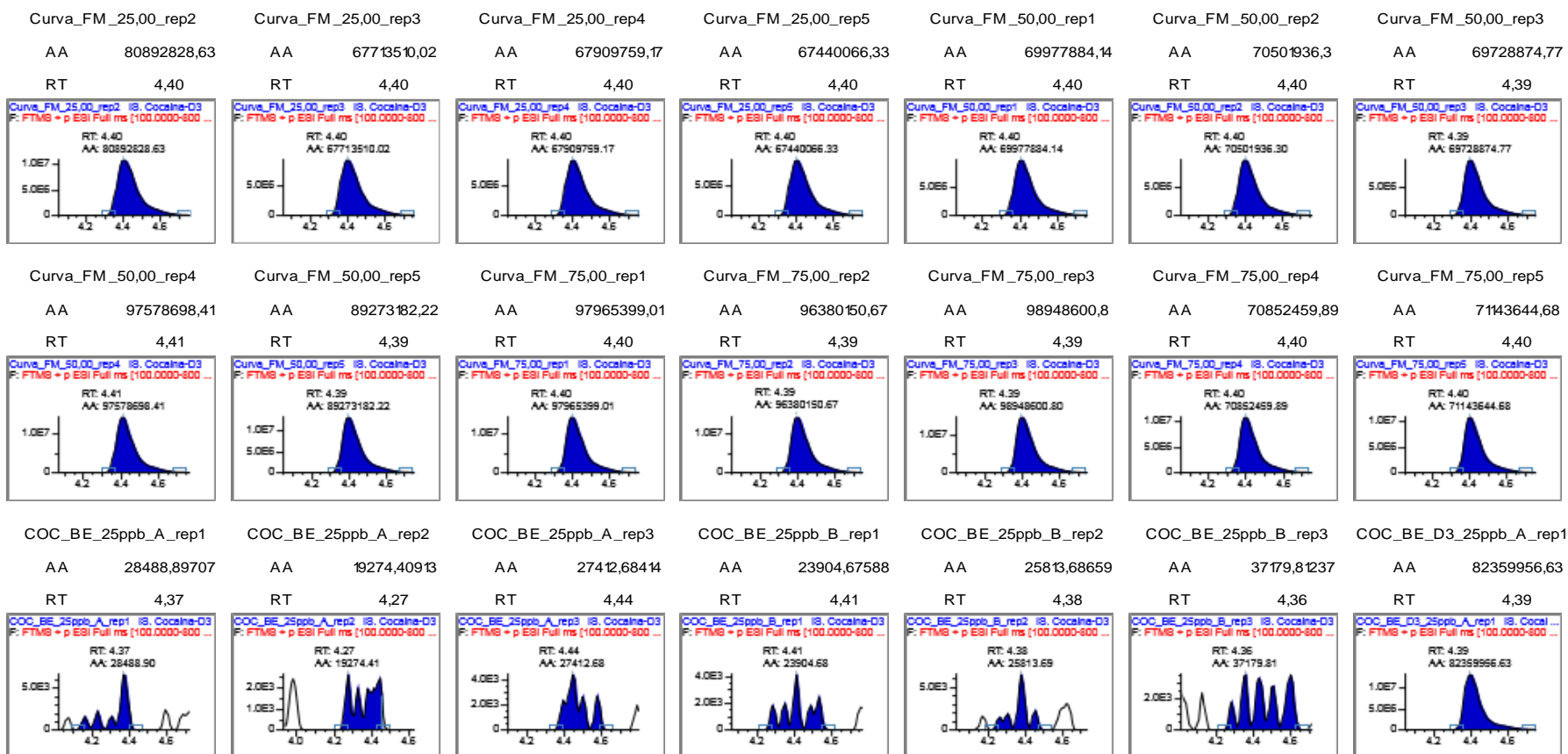
ANEXO VI

Cromatogramas



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



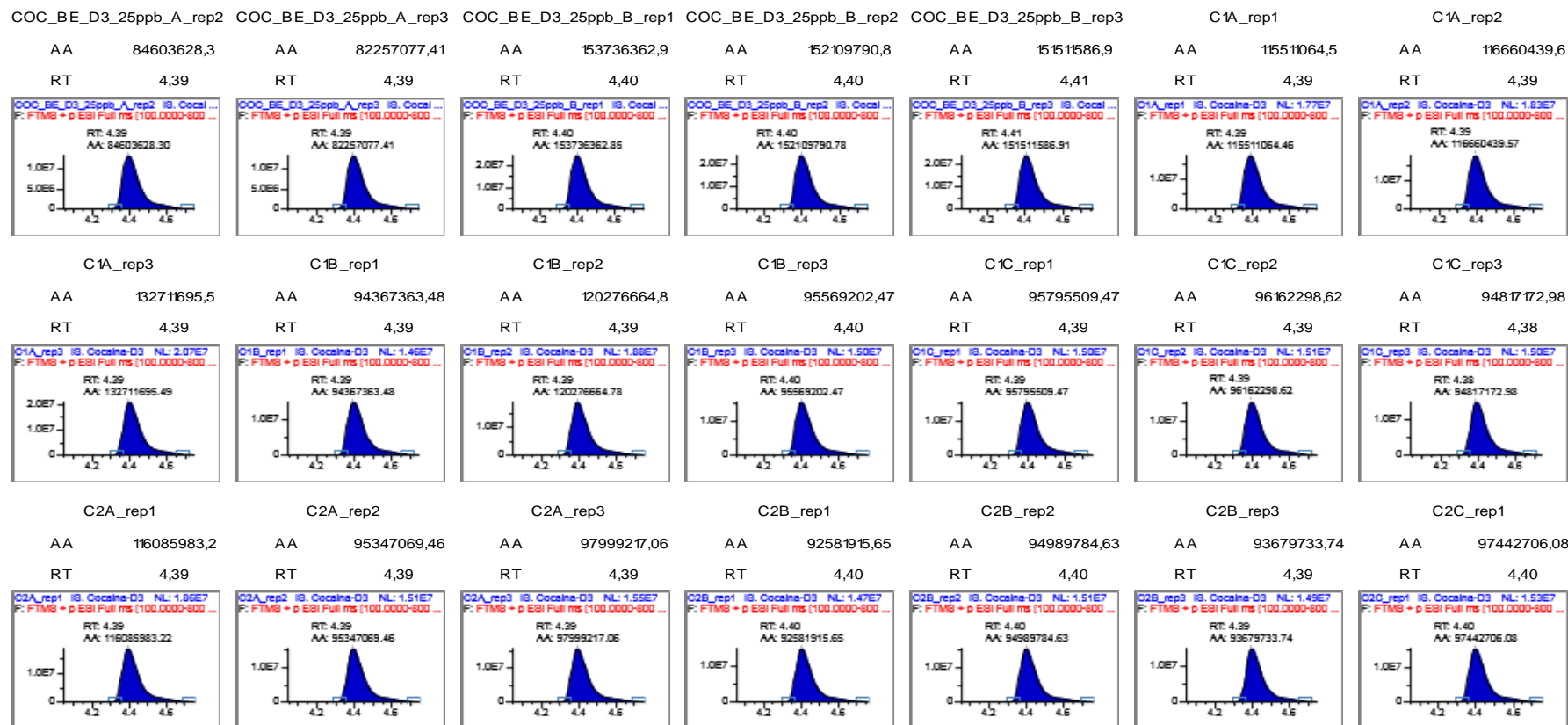
Cromatogramas: performance do método. CT = controle; AM = amostra de pool de água de rio; FM = solução de fase móvel.

ANEXO VI

Cromatogramas



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



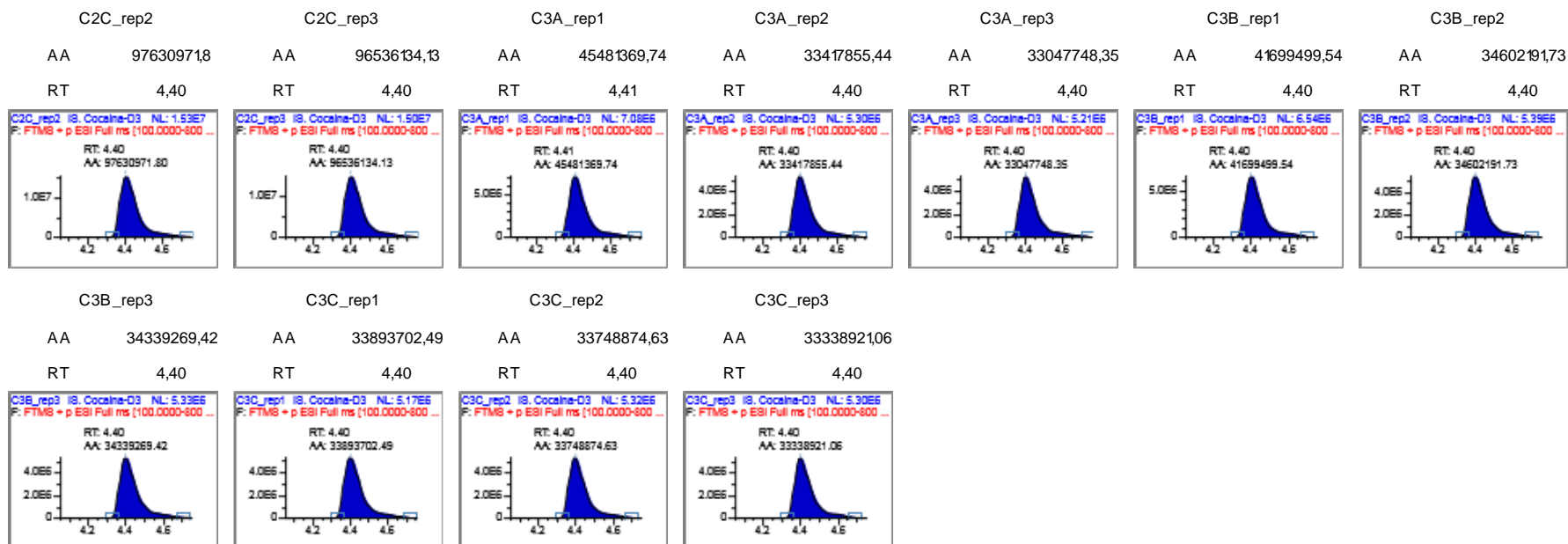
Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.

ANEXO VI
Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: 20220207_validacao2.3_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method TVIL_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220207_Validacao2\20220207_validacao2.3



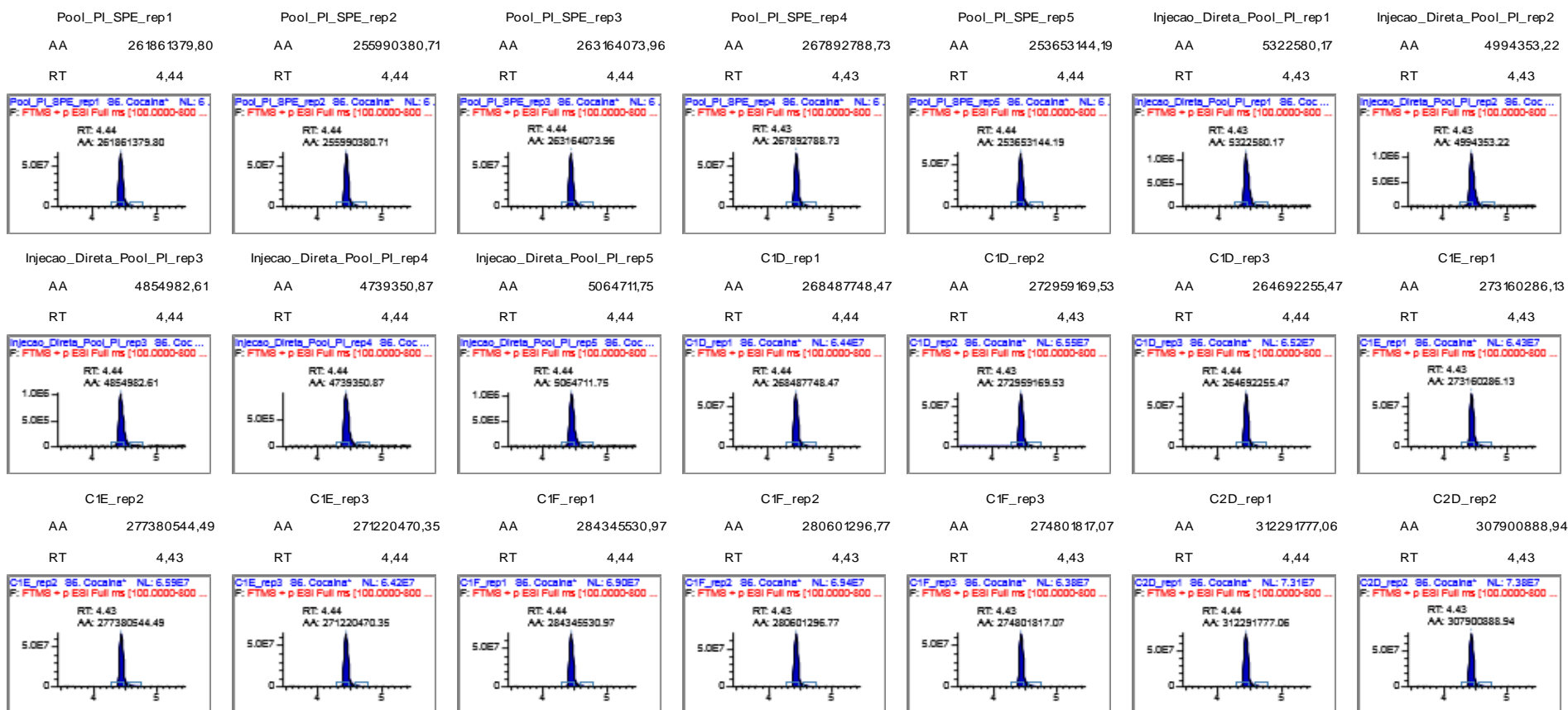
Cromatogramas: performance do método. C1A-C1C, C2A-C2C e C3A-C3C = injeção de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em água ultrapura.

ANEXO VI

Cromatogramas



Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



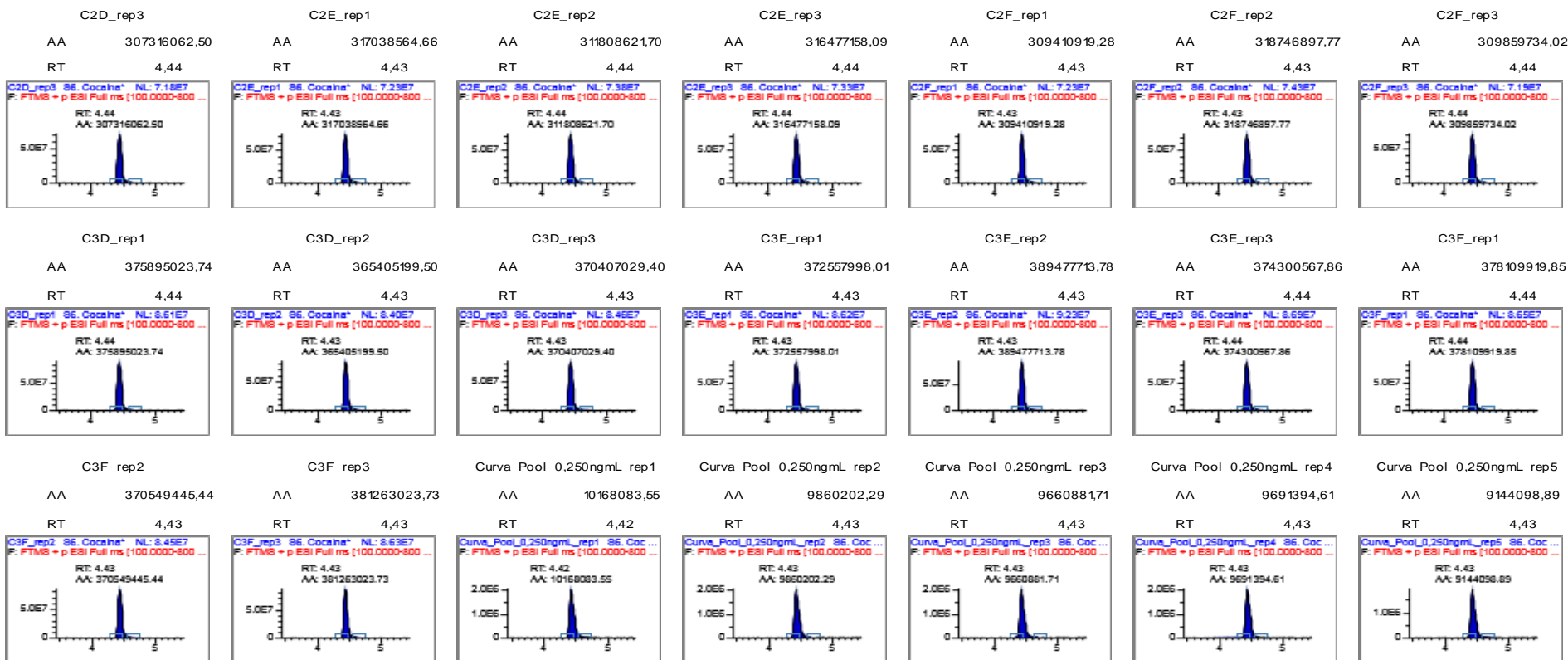
Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

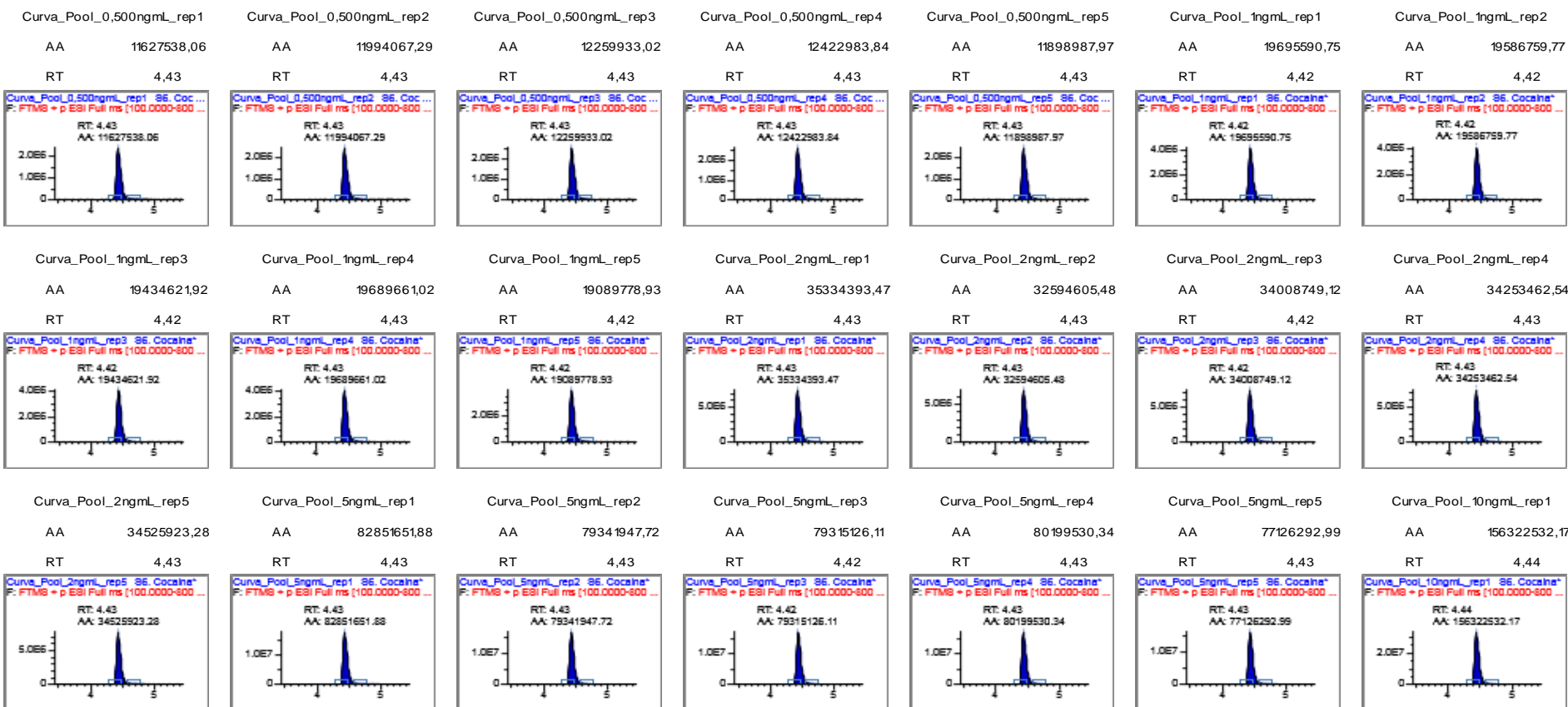
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

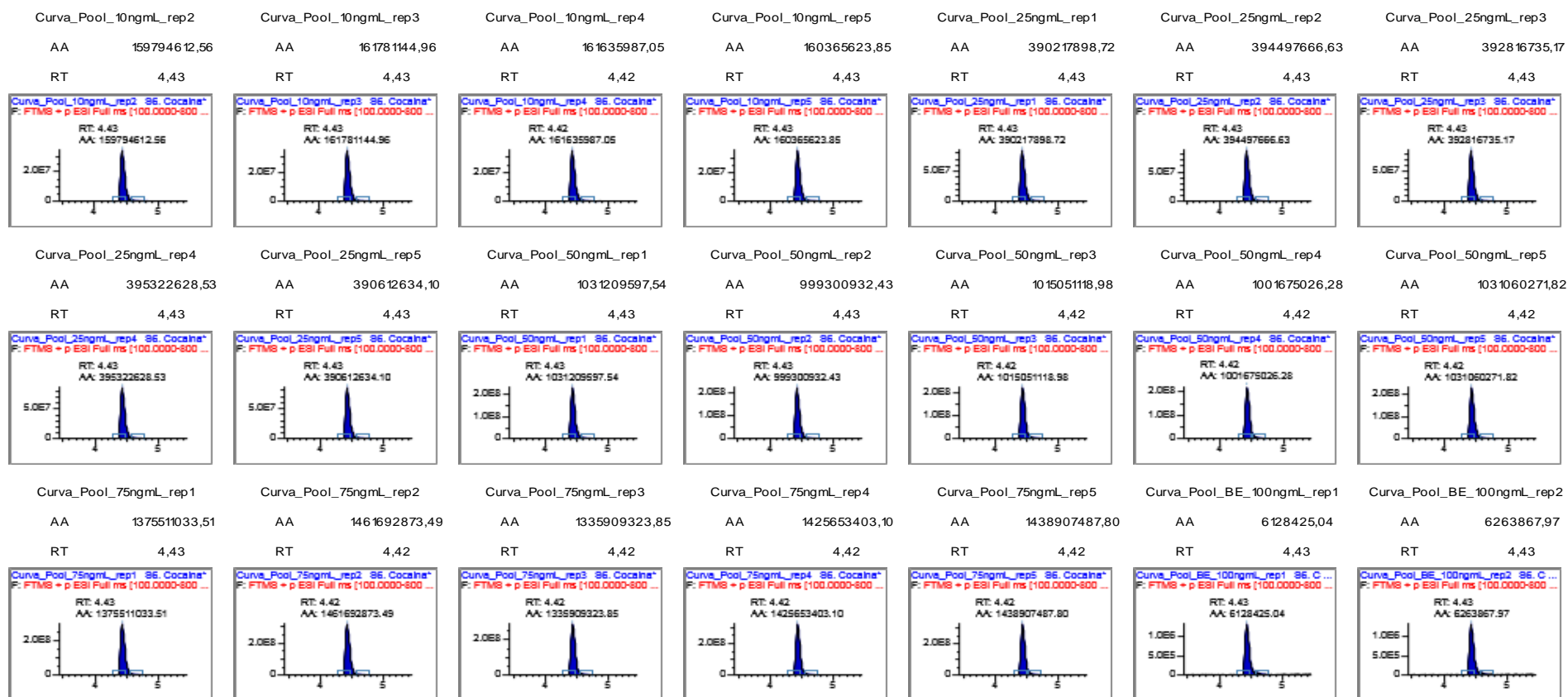
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

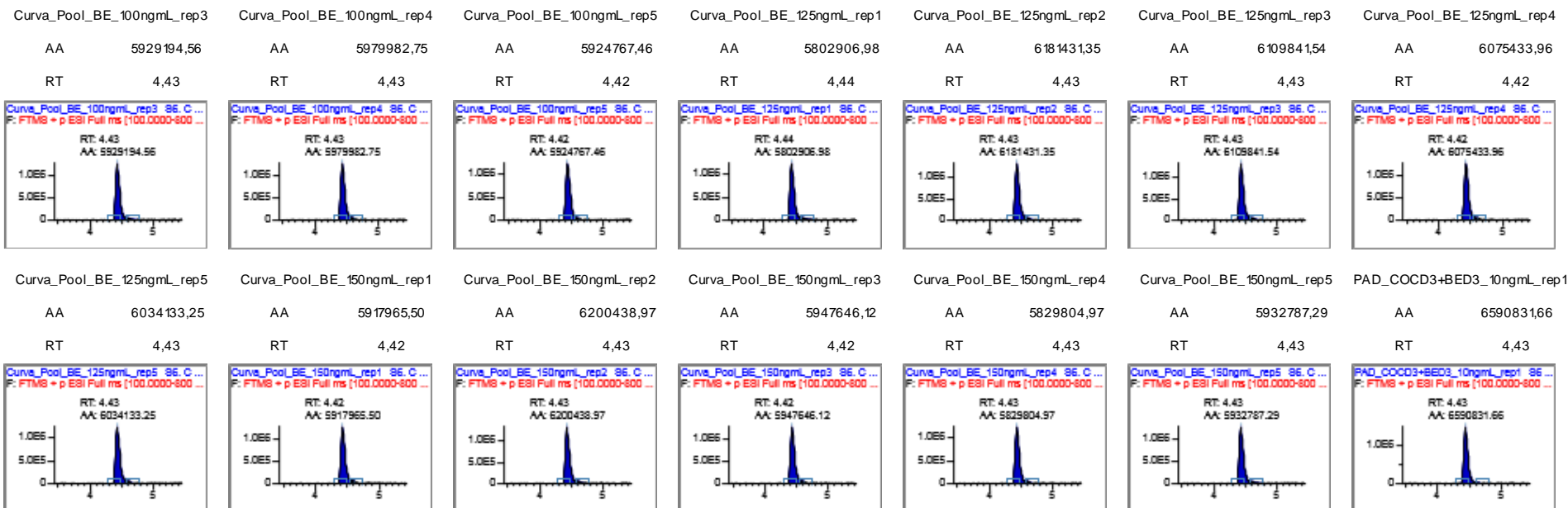
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6.Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



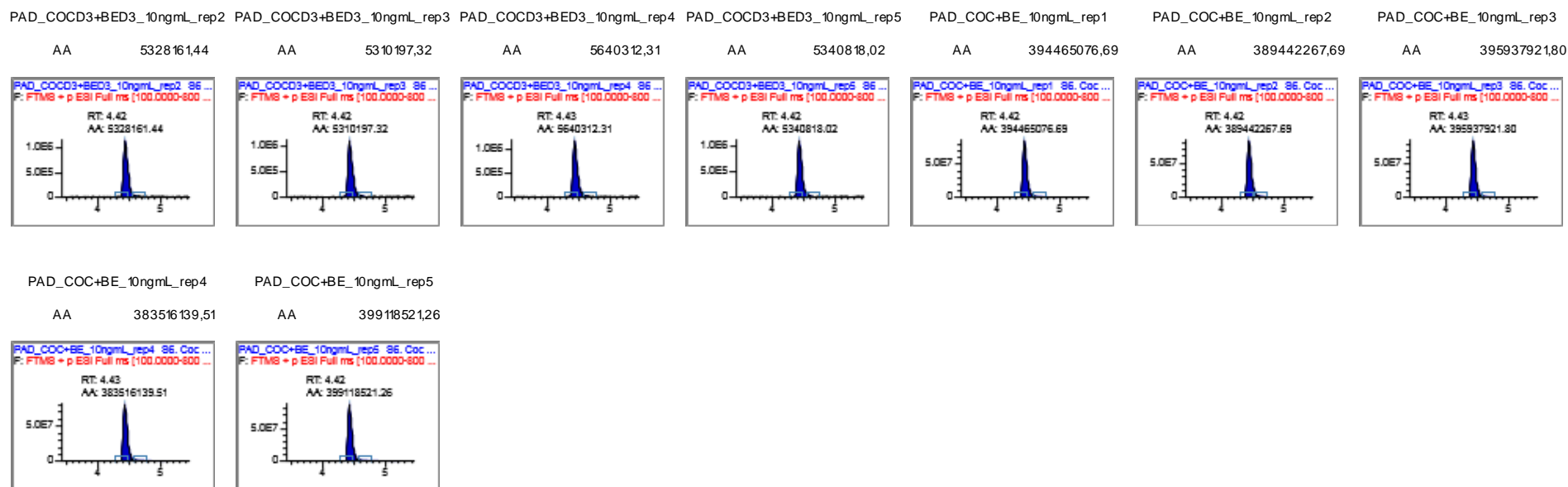
Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

ANEXO VI
Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
m/z 304,15433
Lot number:
Instrument Method TVII_i_GABRIEL
Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. PAD_COCD3+BED3 = inj. de solução contendo apenas as versões deuteradas de COC e BE em pool de água de rio.

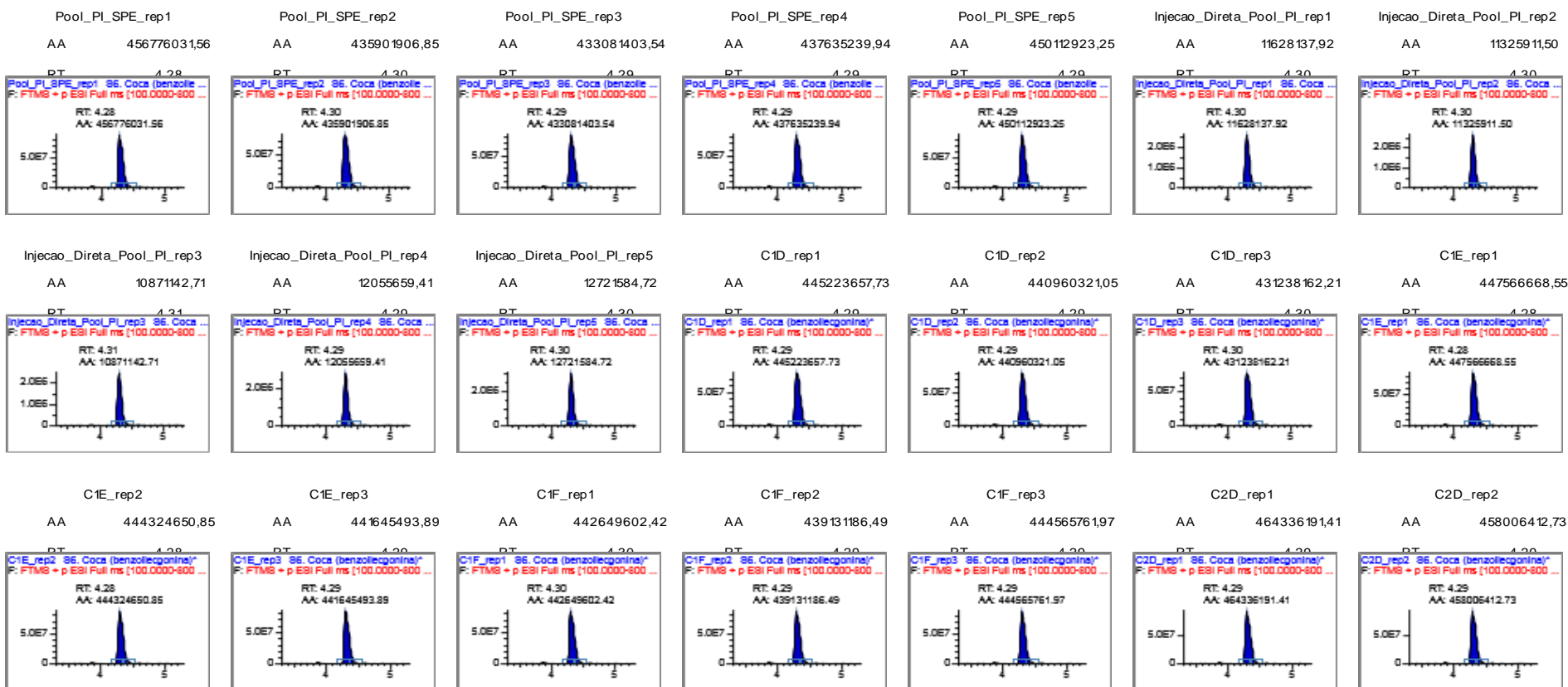
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

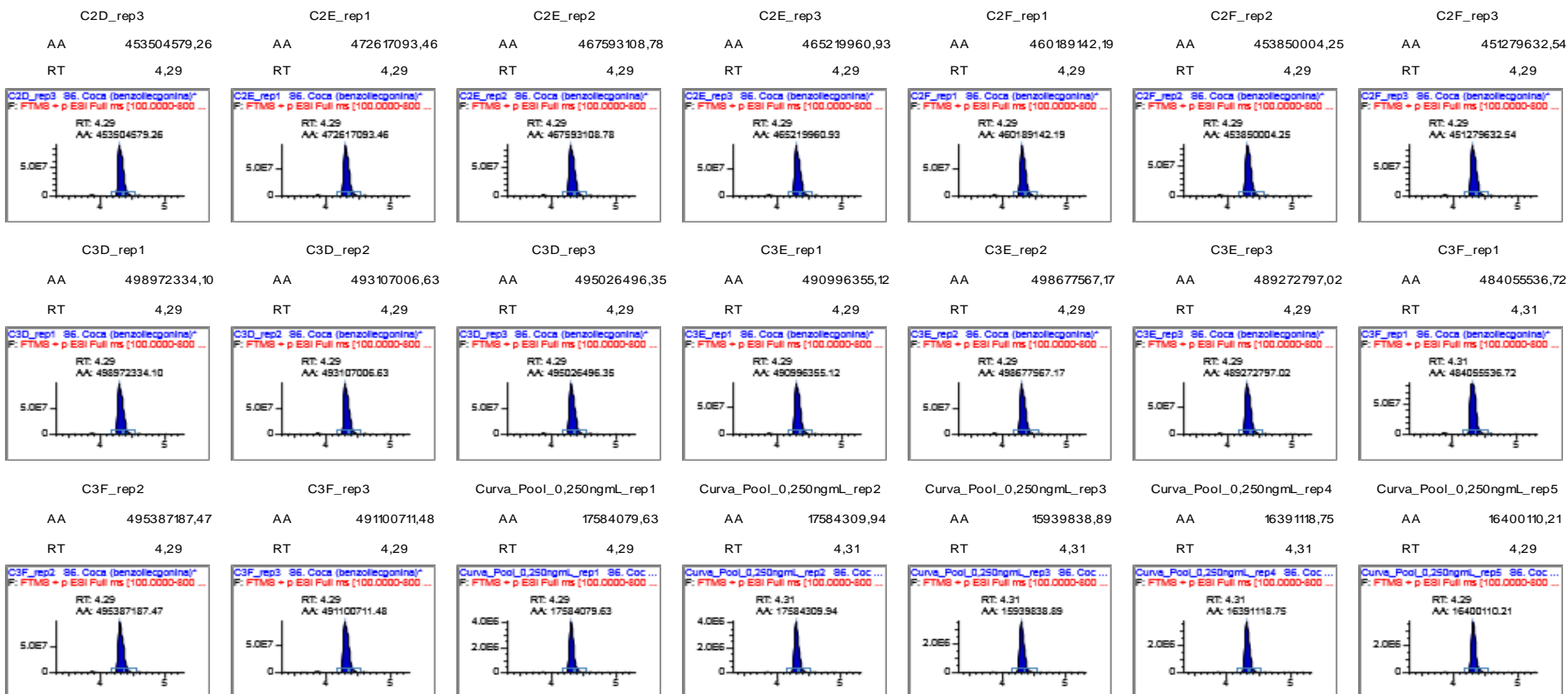
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

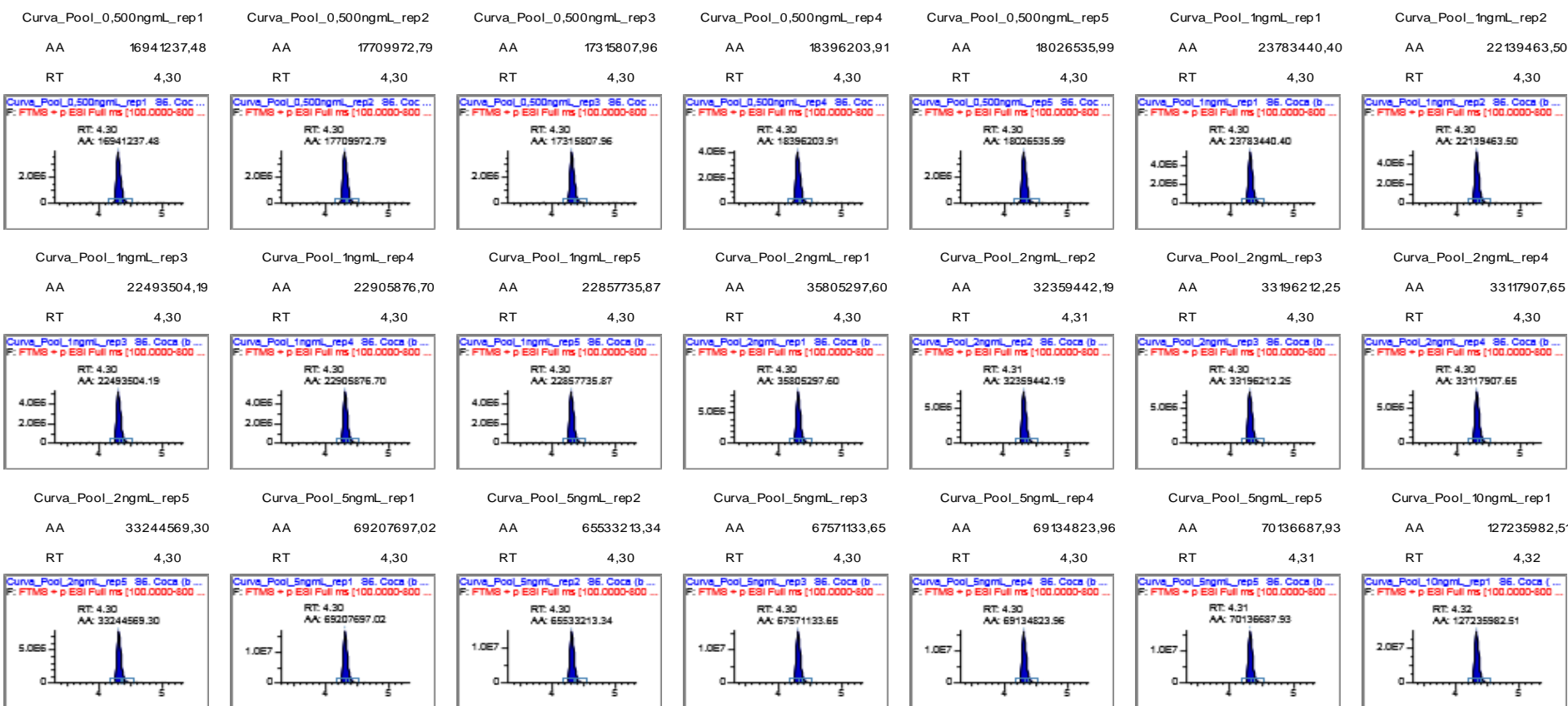
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

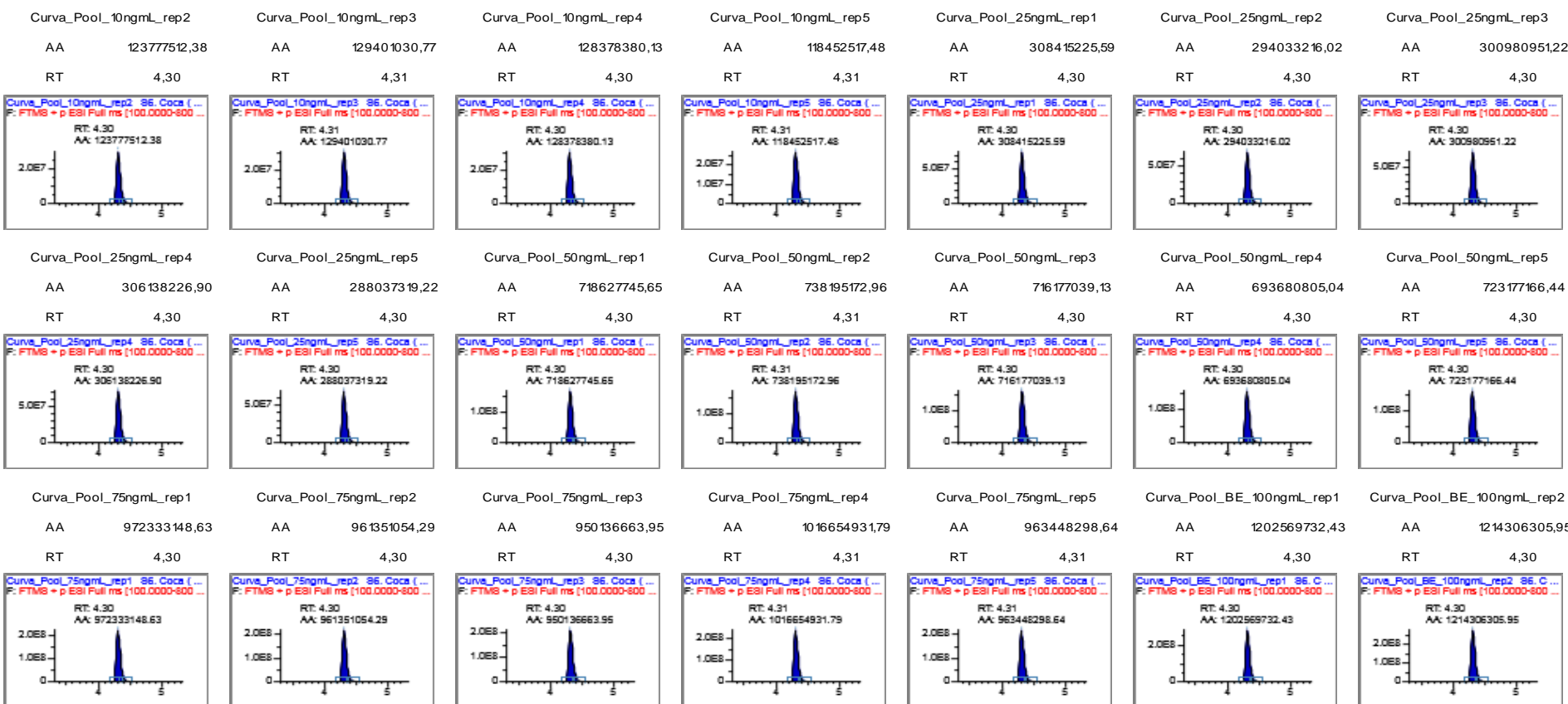
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

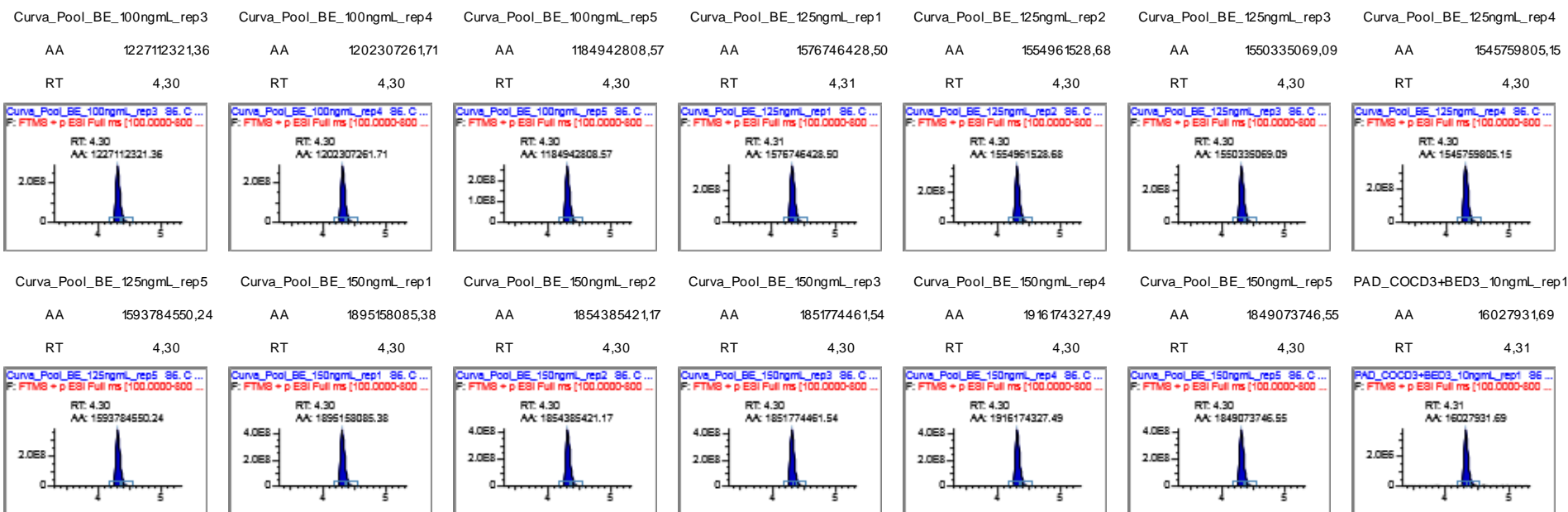
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



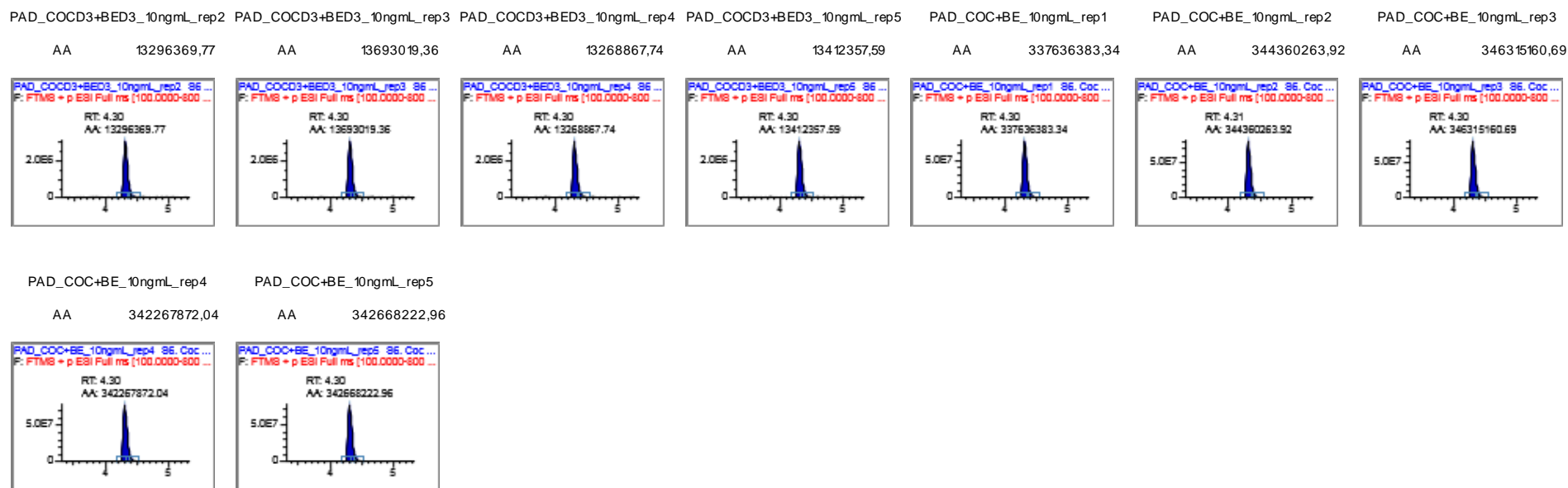
Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

ANEXO VI
Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
m/z 290,13868
Lot number:
Instrument Method TVII_i_GABRIEL
Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. PAD_COCD3+BED3 = inj. de solução contendo apenas as versões deuteradas de COC e BE em pool de água de rio.

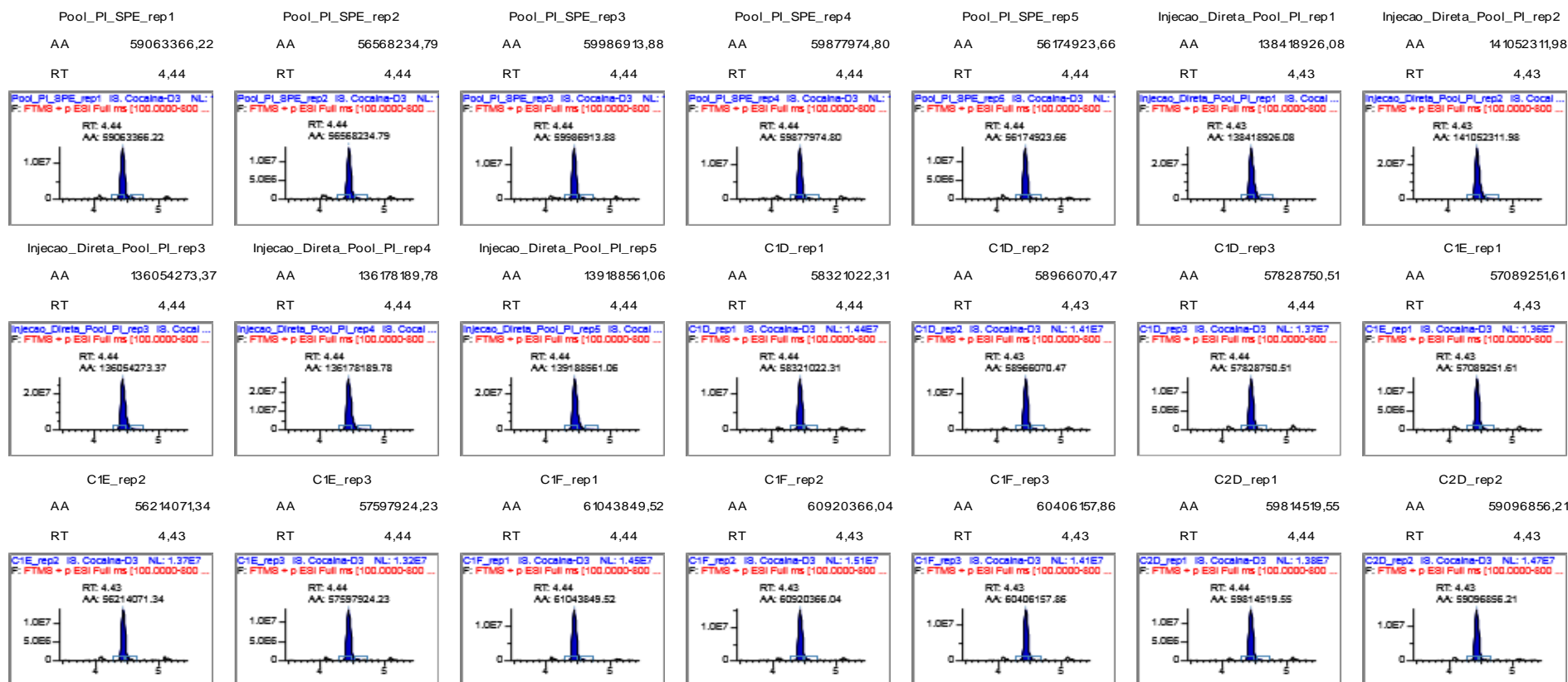
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

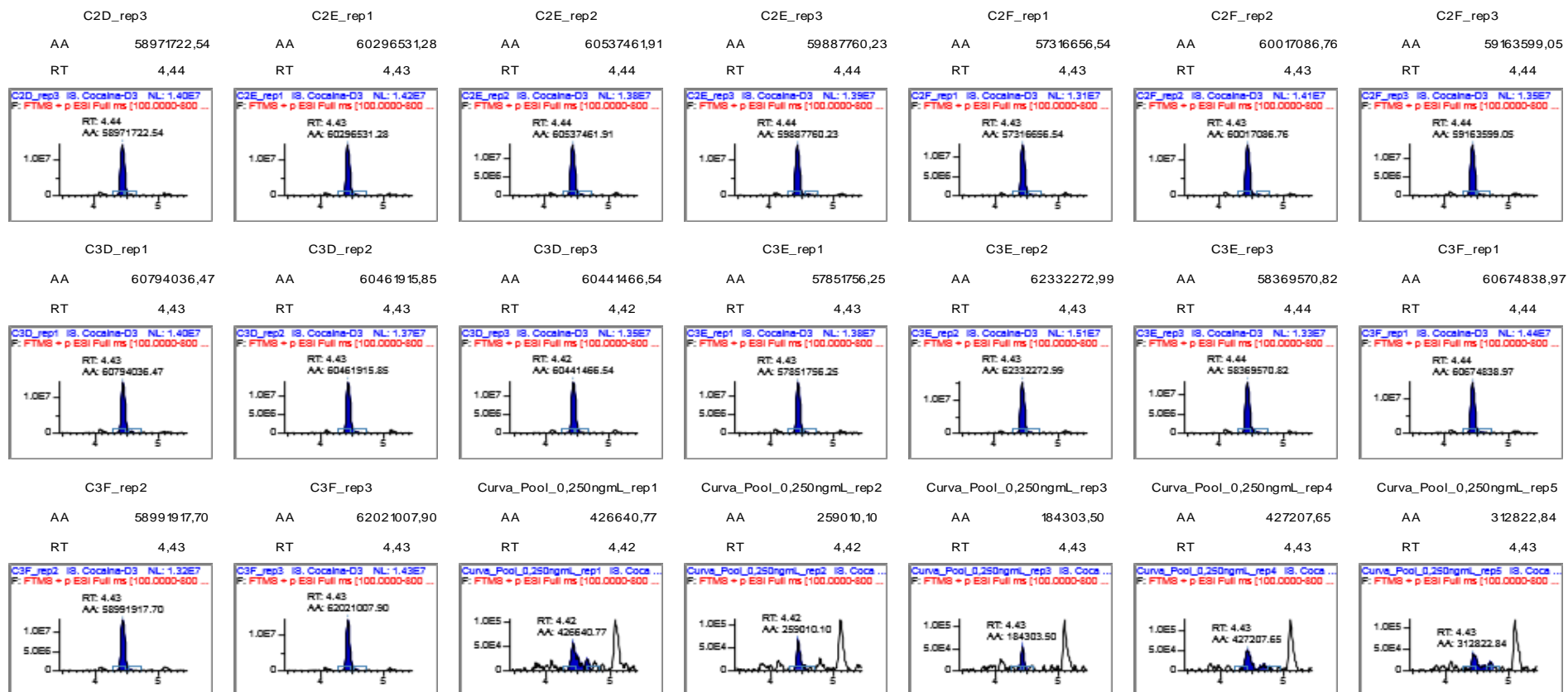
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. C1D-C1F, C2D-C2F e C3D-C3F = inj. de COC e BE (10, 50 e 125 ng L⁻¹, respectivamente) em pool de água de rio.

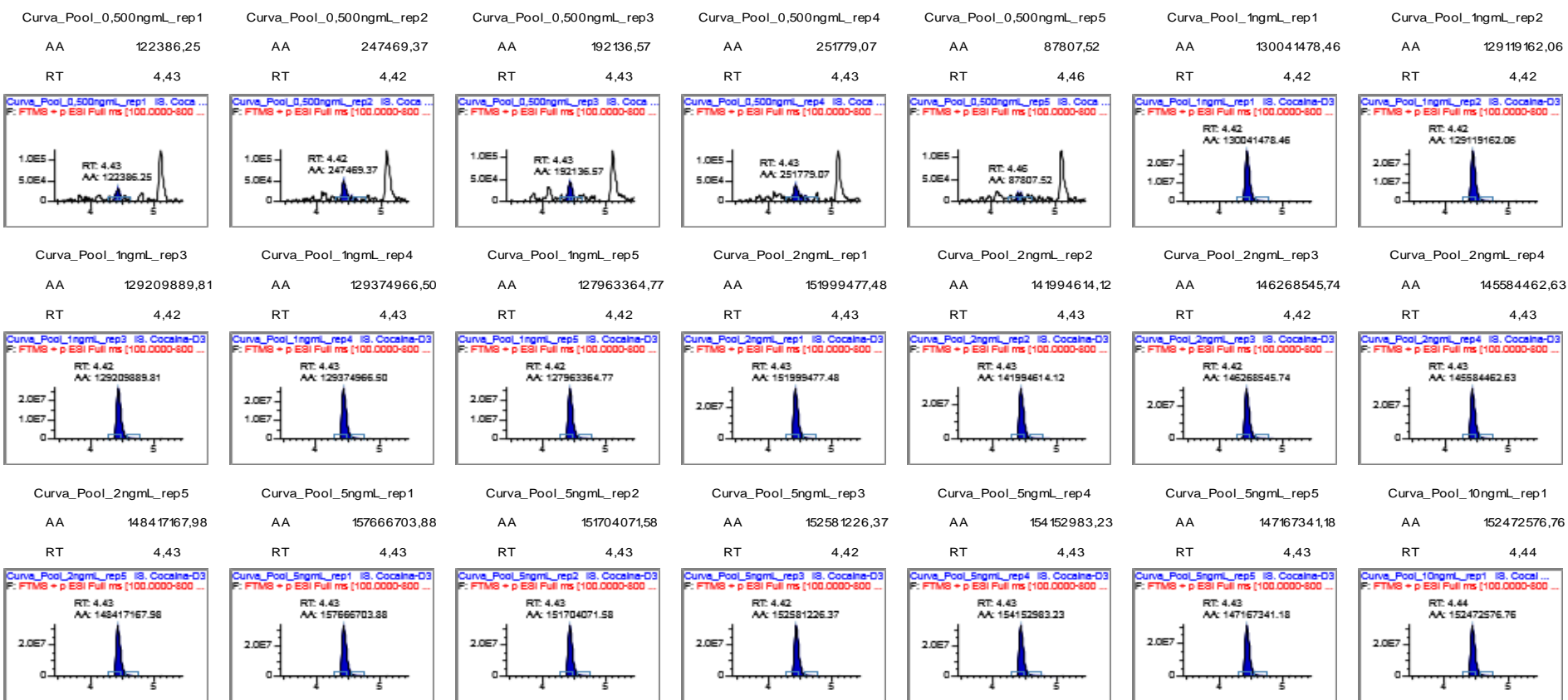
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

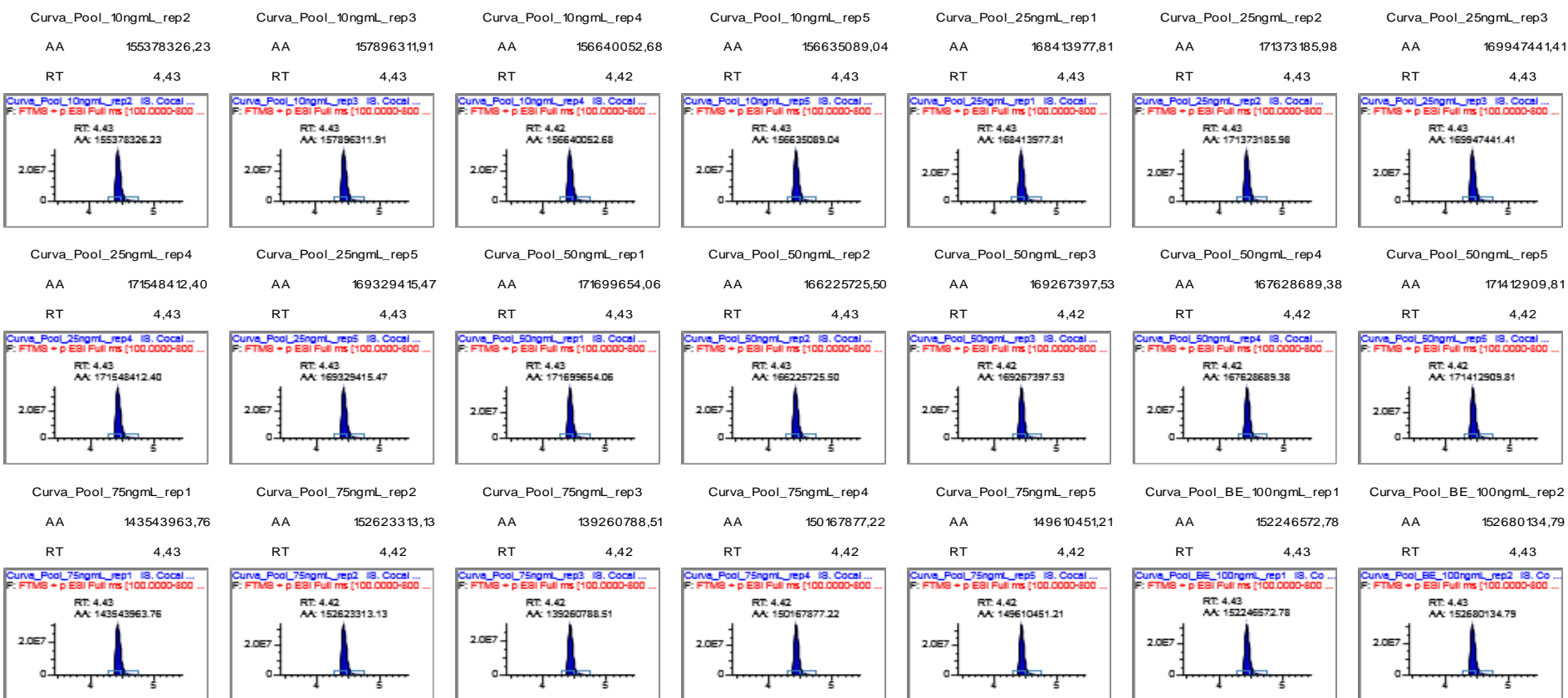
ANEXO VI

Cromatogramas



Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Cromatogramas: performance do método. Curva_Pool = curva analítica realizada em pool de água de rio.

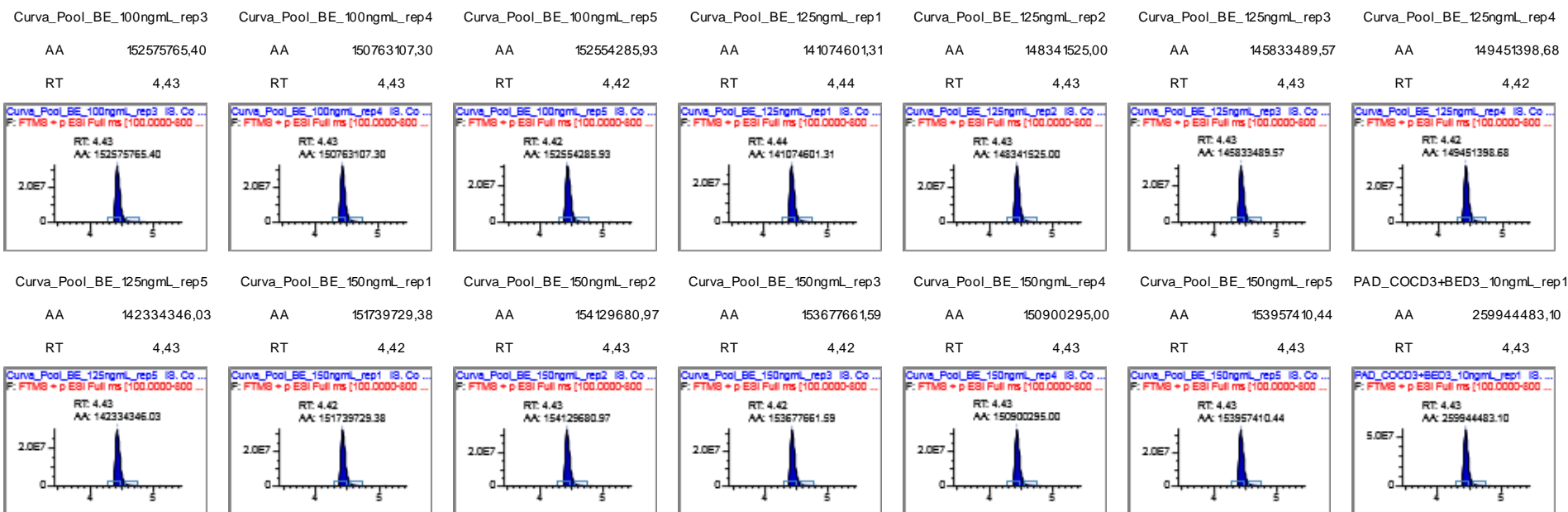
ANEXO VI

Cromatogramas



LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6. Cocaina-D3* Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z: 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT



Cromatogramas: performance do método. PAD_COCD3+BED3 = inj. de solução contendo apenas as versões deuteradas de COC e BE em pool de água de rio.

ANEXO VI
Cromatogramas



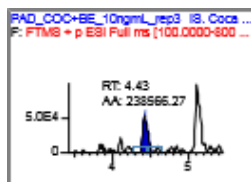
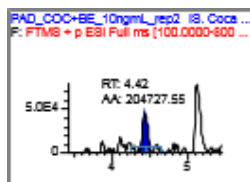
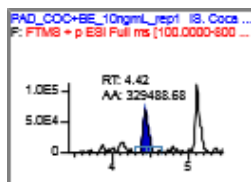
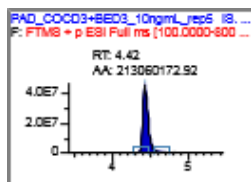
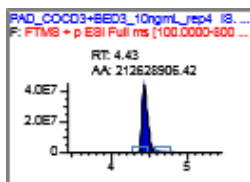
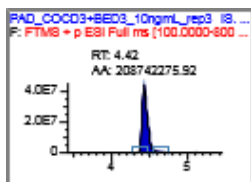
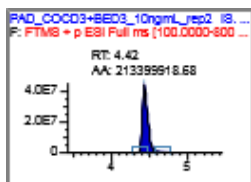
Compound: S6. Cocaina-D3*
m/z 307,17316
Lot number:
Instrument Method TVII_i_GABRIEL
Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220622_Validacao5\VALIDACION_5_REPORT

Sequence Name: VALIDACION_5_REPORT_Cocaina_1_GABRIEL

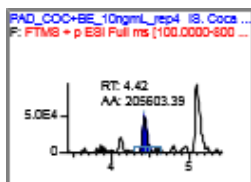


LC-HRMS - ORBITRAP analyses

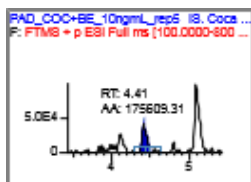
PAD_COCD3+BED3_10ngmL_rep2	PAD_COCD3+BED3_10ngmL_rep3	PAD_COCD3+BED3_10ngmL_rep4	PAD_COCD3+BED3_10ngmL_rep5	PAD_COC+BE_10ngmL_rep1	PAD_COC+BE_10ngmL_rep2	PAD_COC+BE_10ngmL_rep3
AA 213399918,68	AA 208742275,92	AA 212628906,42	AA 213060172,92	AA 329488,68	AA 204727,55	AA 238566,27



PAD_COC+BE_10ngmL_rep4
AA 205603,39



PAD_COC+BE_10ngmL_rep5
AA 175609,31



Cromatogramas: performance do método. PAD_COCD3+BED3 = inj. de solução contendo apenas as versões deuteradas de COC e BE em pool de água de rio.

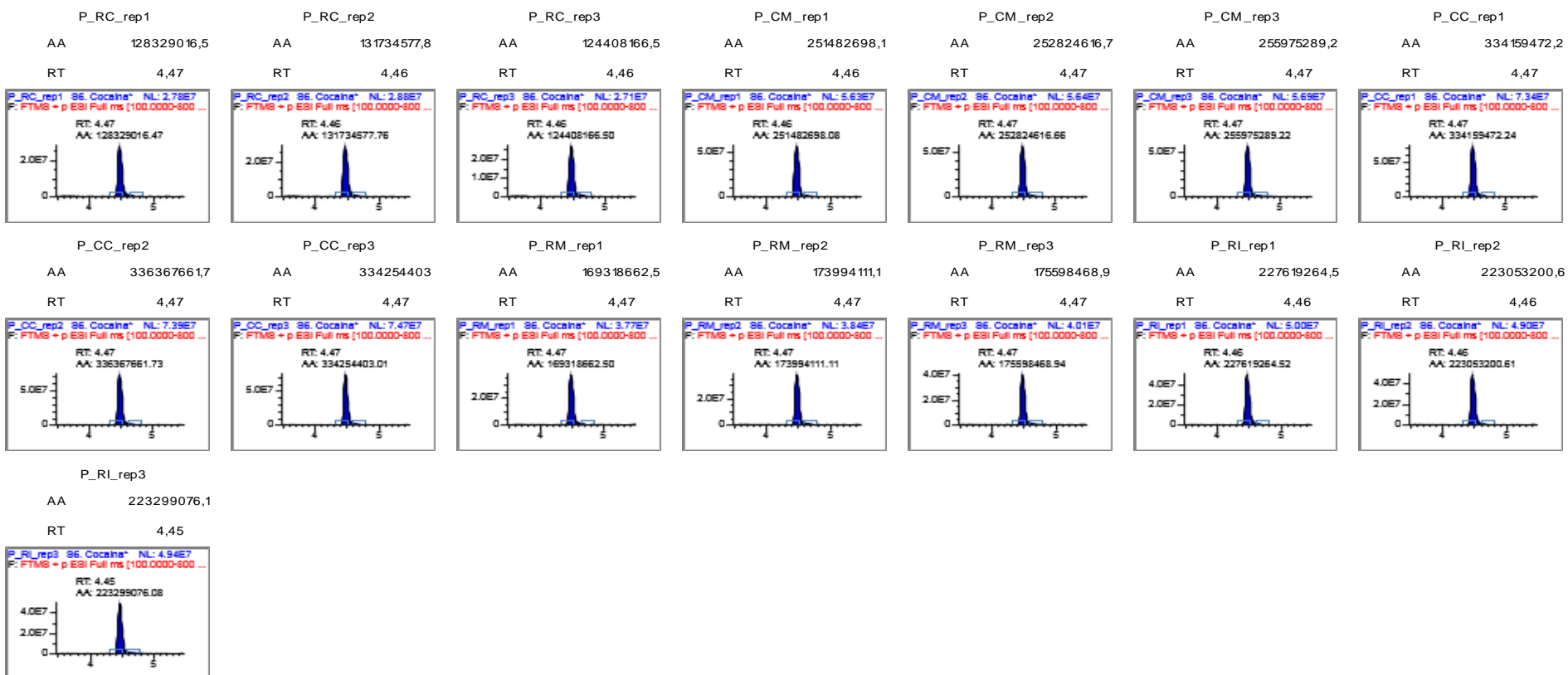
ANEXO VI

Cromatogramas

LC-HRMS - ORBITRAP analyses



Compound: S6. Cocaina* Sequence Name: 20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjecao_Cocaina 1 GARRIFI
 m/z: 304,15433
 Lot number:
 Instrument Method: TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220523_Validacao4_Coleta_Rein\20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjecao

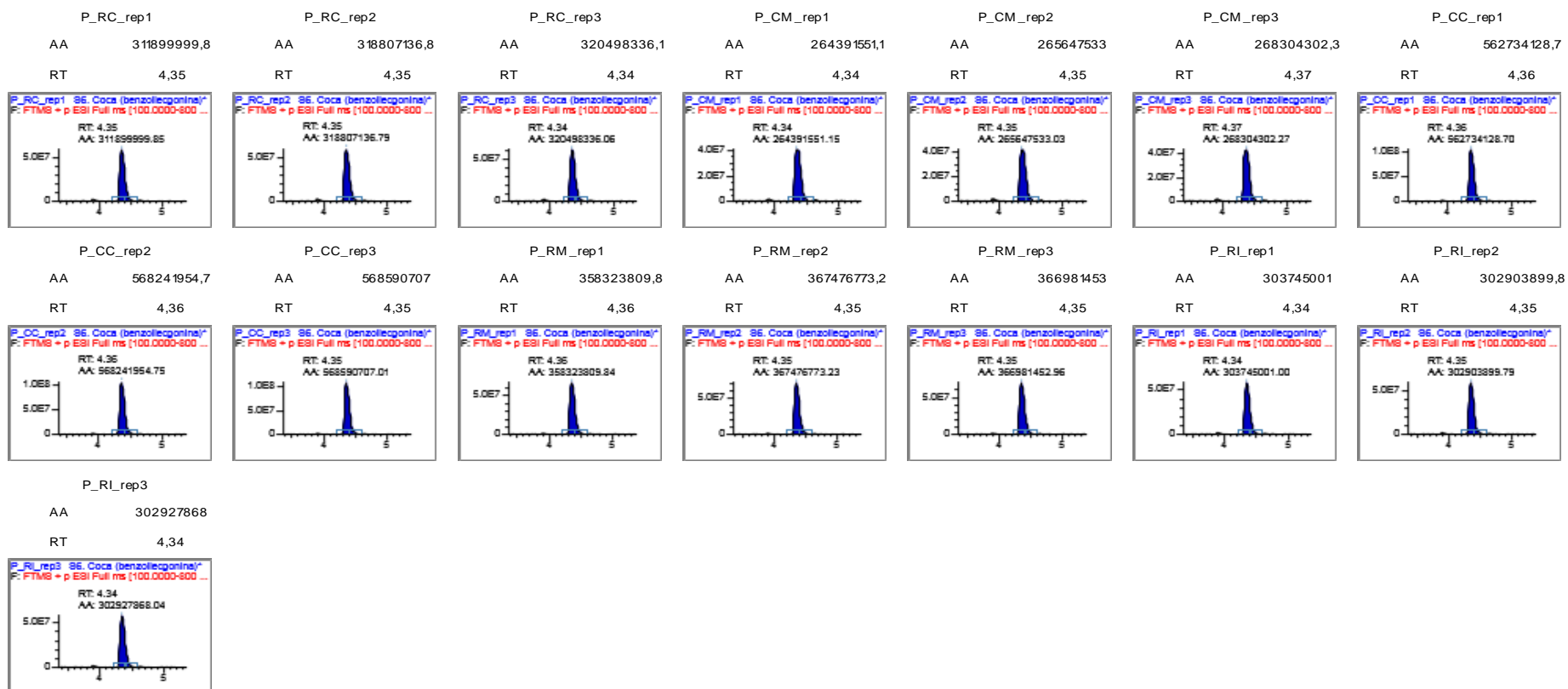


Cromatogramas: campanha de monitoramento - maio de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Compound: S6. Benzoilecgonina* Sequence Name: 20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjacao_Cocaina 1 GARRIFI
 m/z 290,13868
 Lot number:
 Instrument Method TVIL_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220523_Validacao4_Coleta_Reinj\20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjacao



Cromatogramas: campanha de monitoramento - maio de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

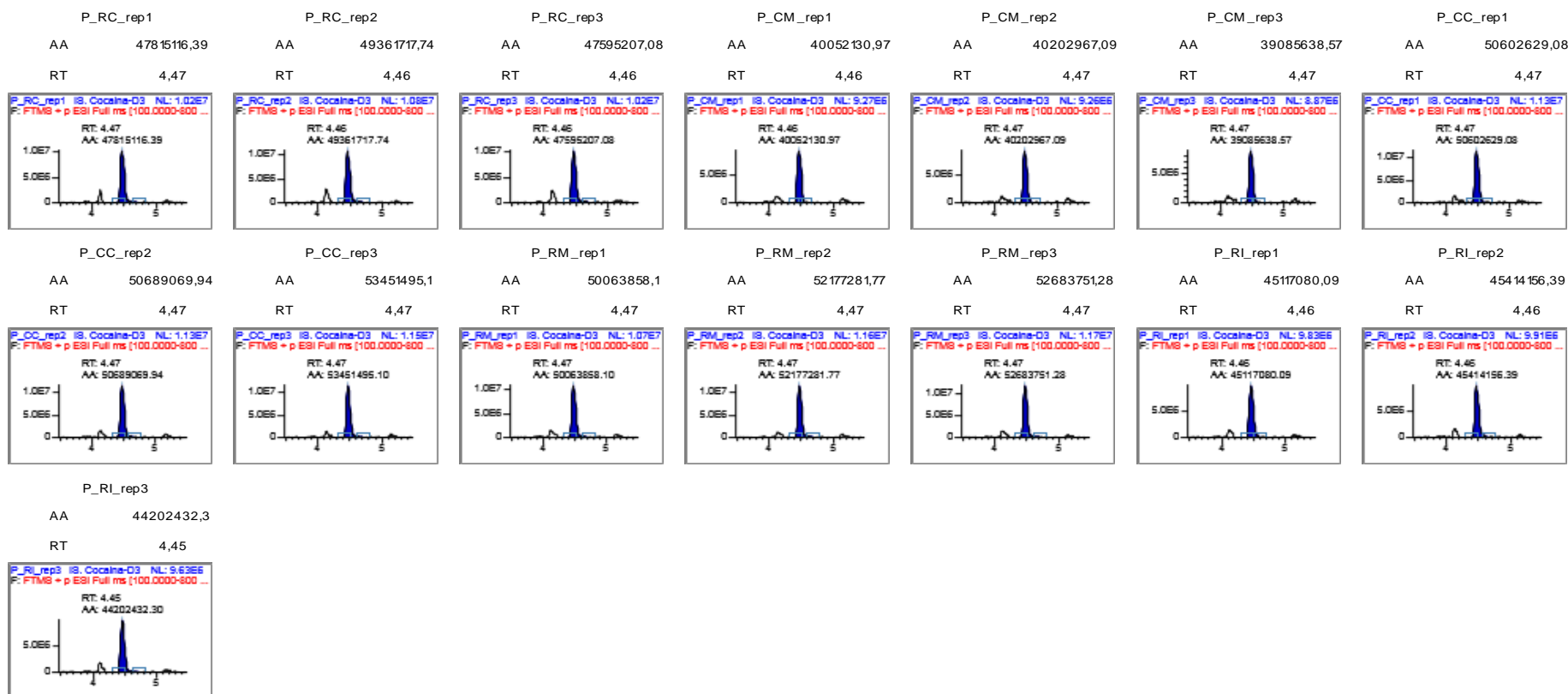
ANEXO VI

Cromatogramas



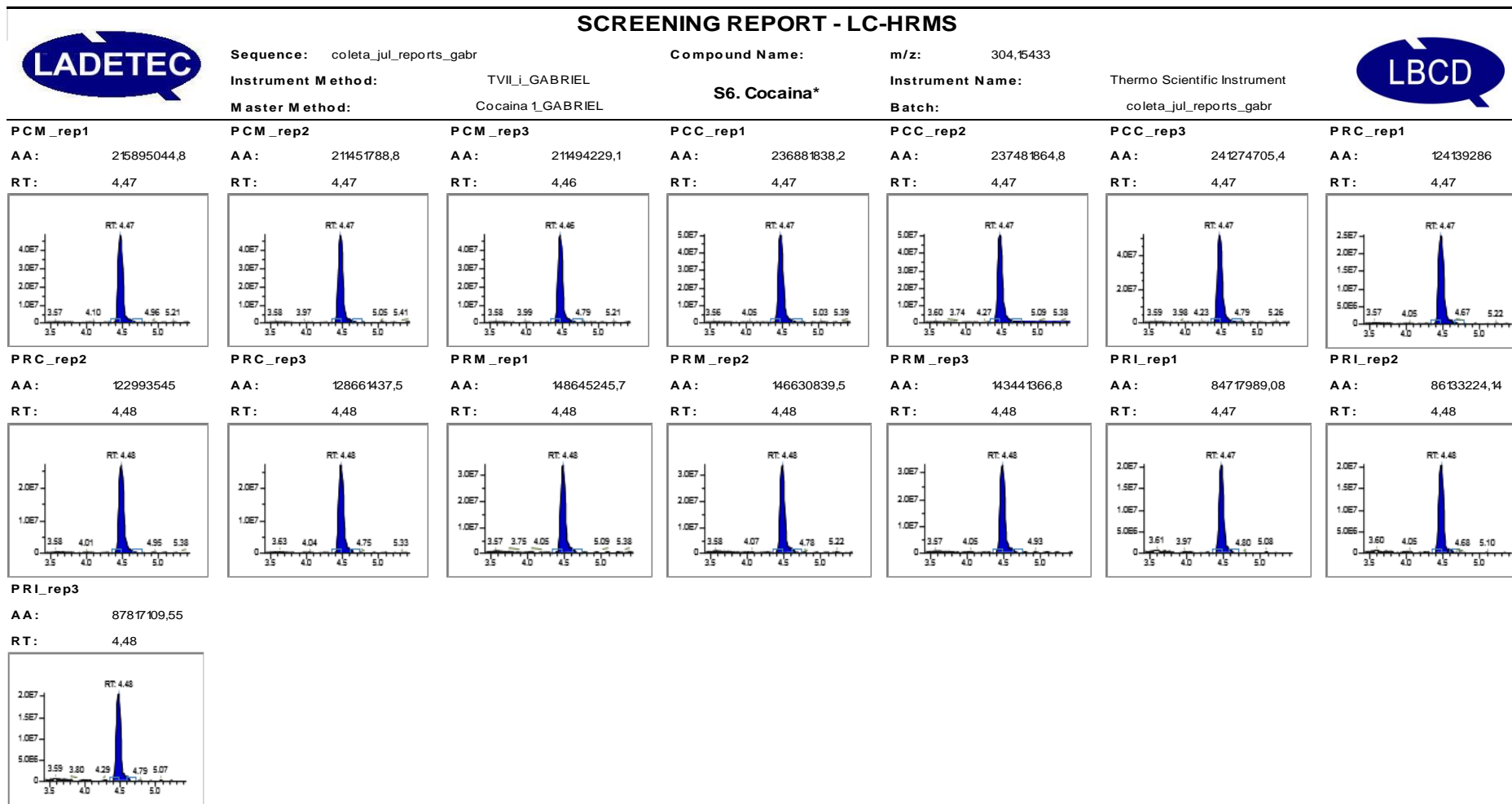
LC-HRMS - ORBITRAP analyses

Compound: S6.Cocaina-D3* Sequence Name: 20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjecao_Cocaina_1_GABRIEL
 m/z 307,17316
 Lot number:
 Instrument Method TVII_i_GABRIEL
 Arquivo: C:\TraceFinderData\32\Projects\Gabriel Farias\20220523_Validacao4_Coleta_Reinj\20220519_Validacao4_Parte_1e2_reinjecao



Cromatogramas: campanha de monitoramento - maio de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - julho de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Sequence: coleta_jul_reports_gabr

Instrument Method: TVII_i_GABRIEL

Master Method: Cocaína_1_GABRIEL

Compound Name: m/z: 290,13868

S6. Benzoilecgonina*

Instrument Name:

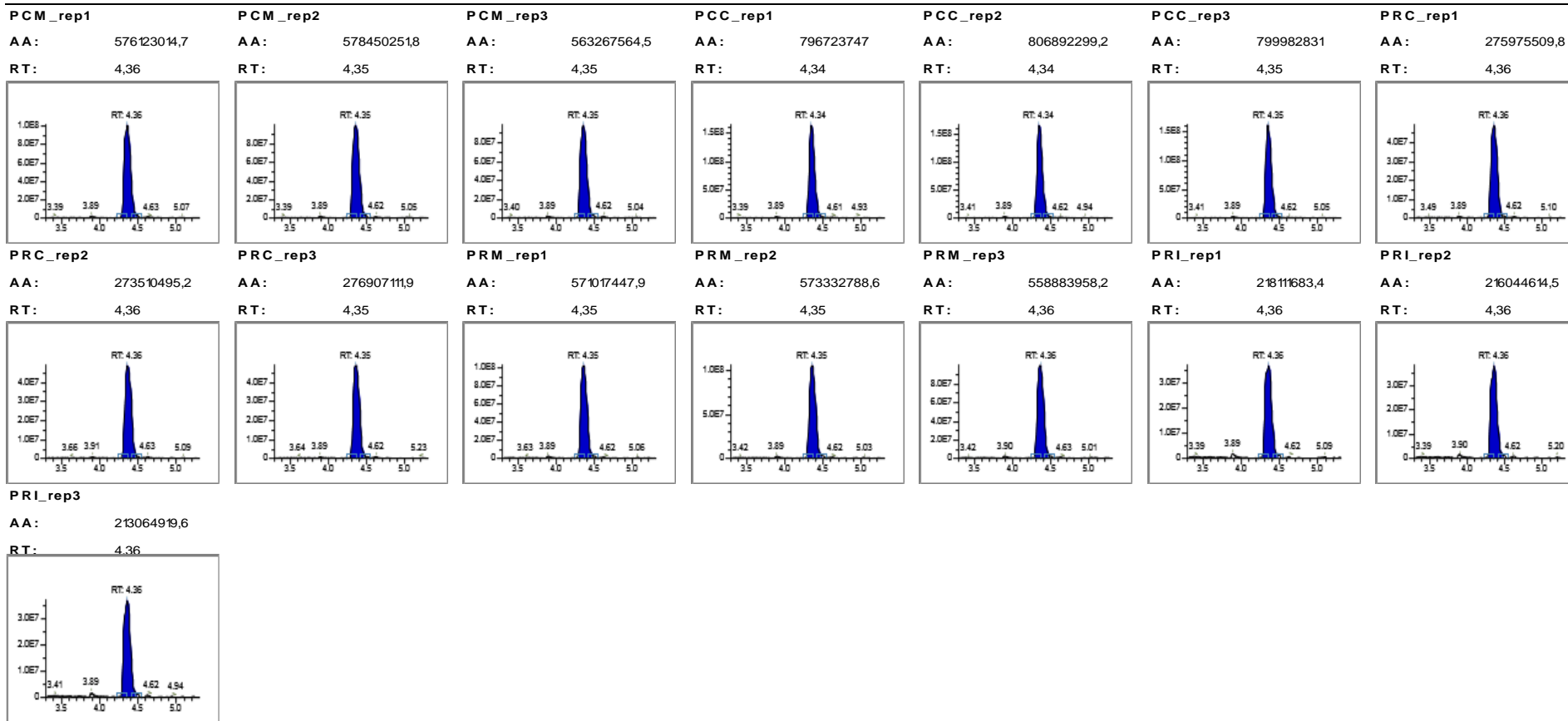
Batch:

Thermo Scientific Instrument

coleta_jul_reports_gabr

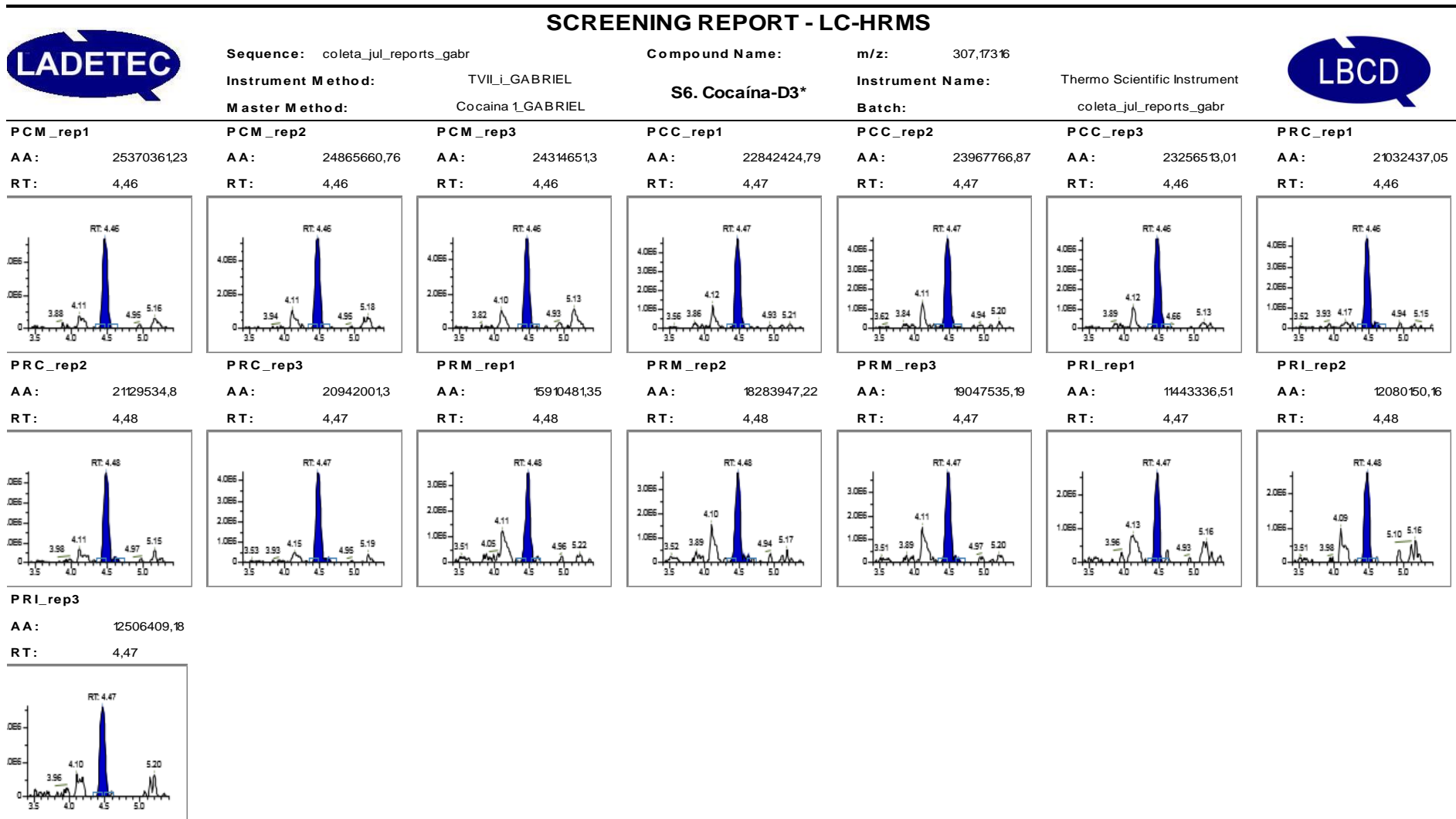


SCREENING REPORT - LC-HRMS



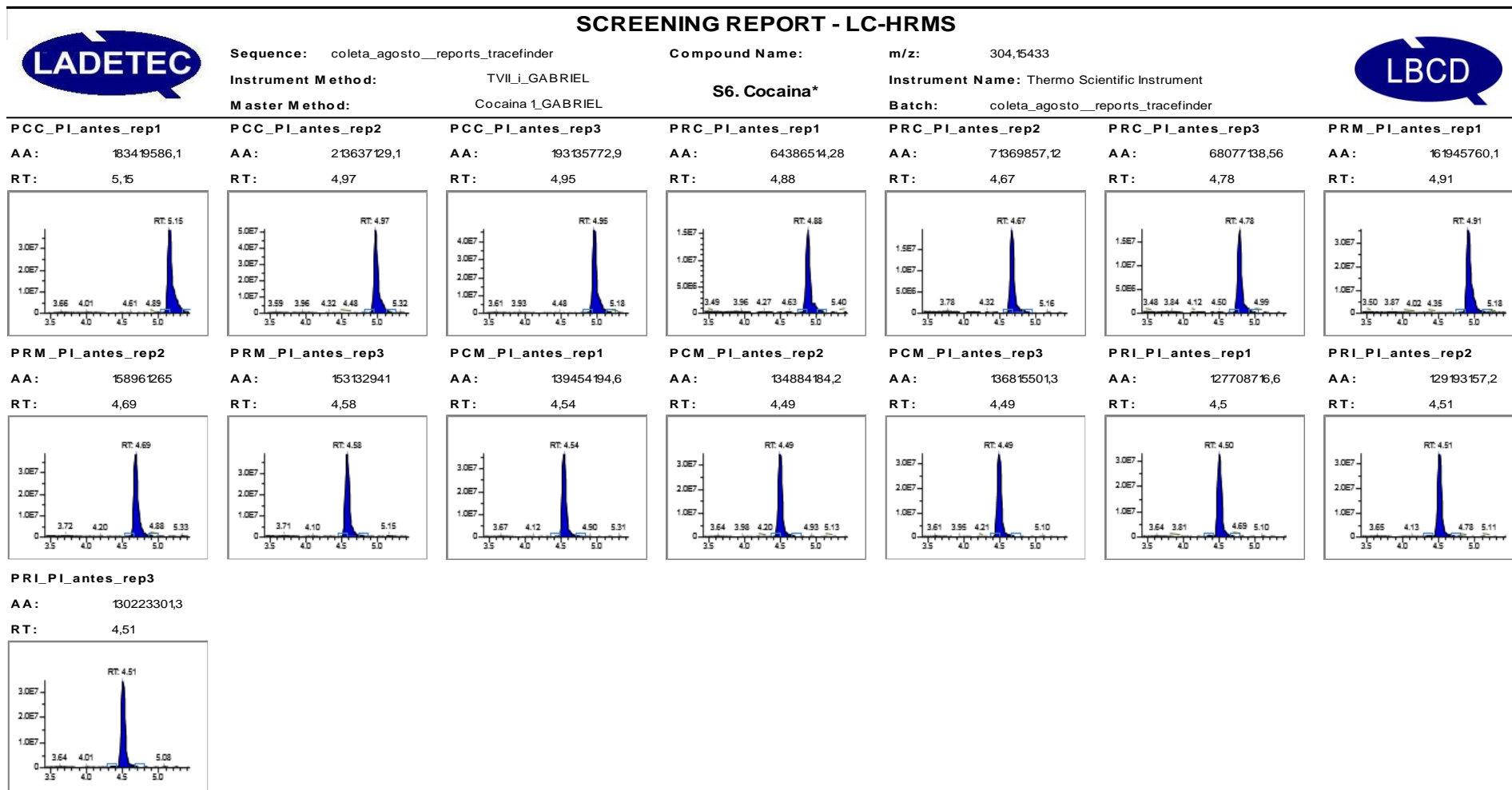
Cromatogramas: campanha de monitoramento - julho de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



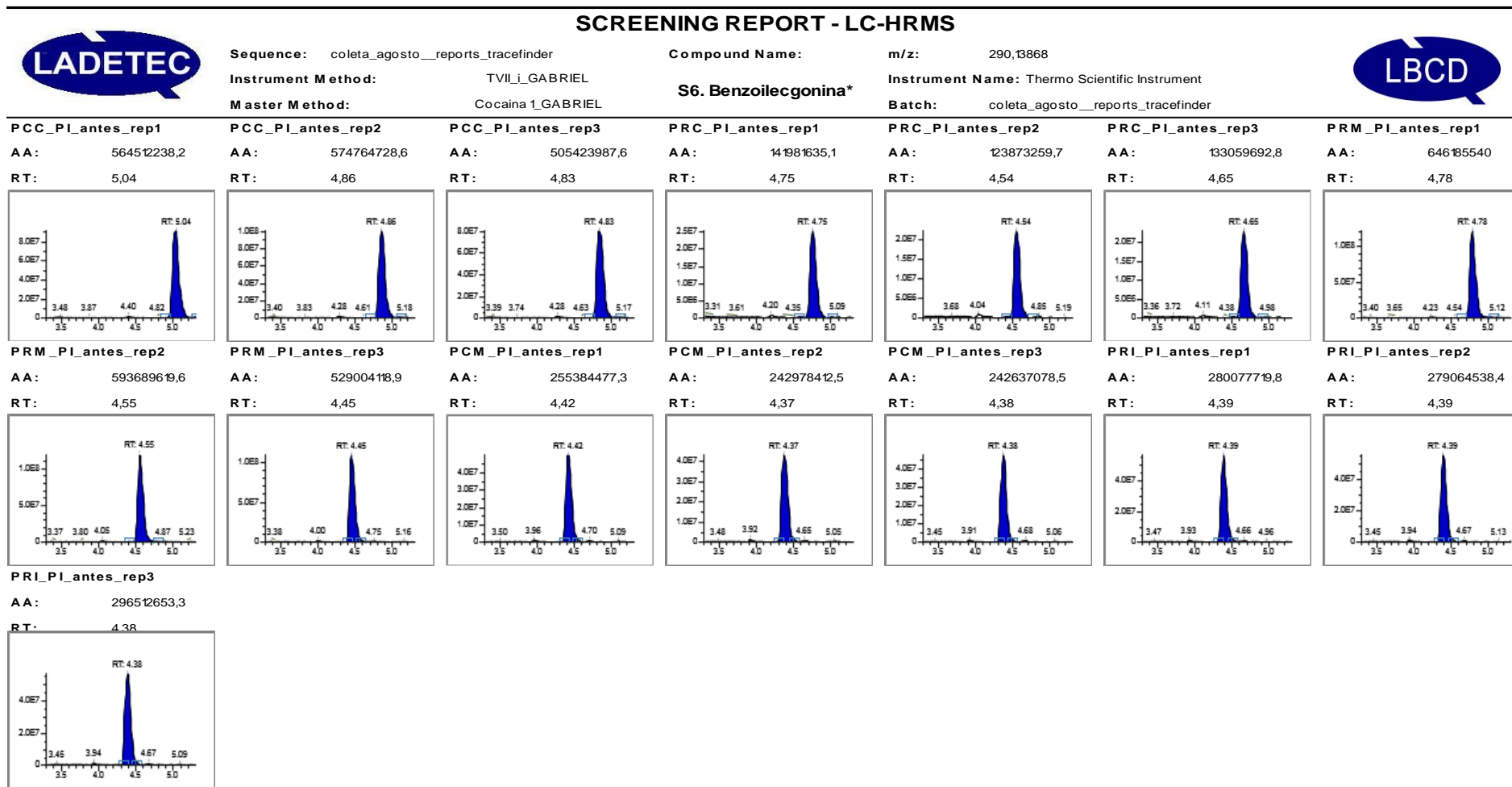
Cromatogramas: campanha de monitoramento - julho de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



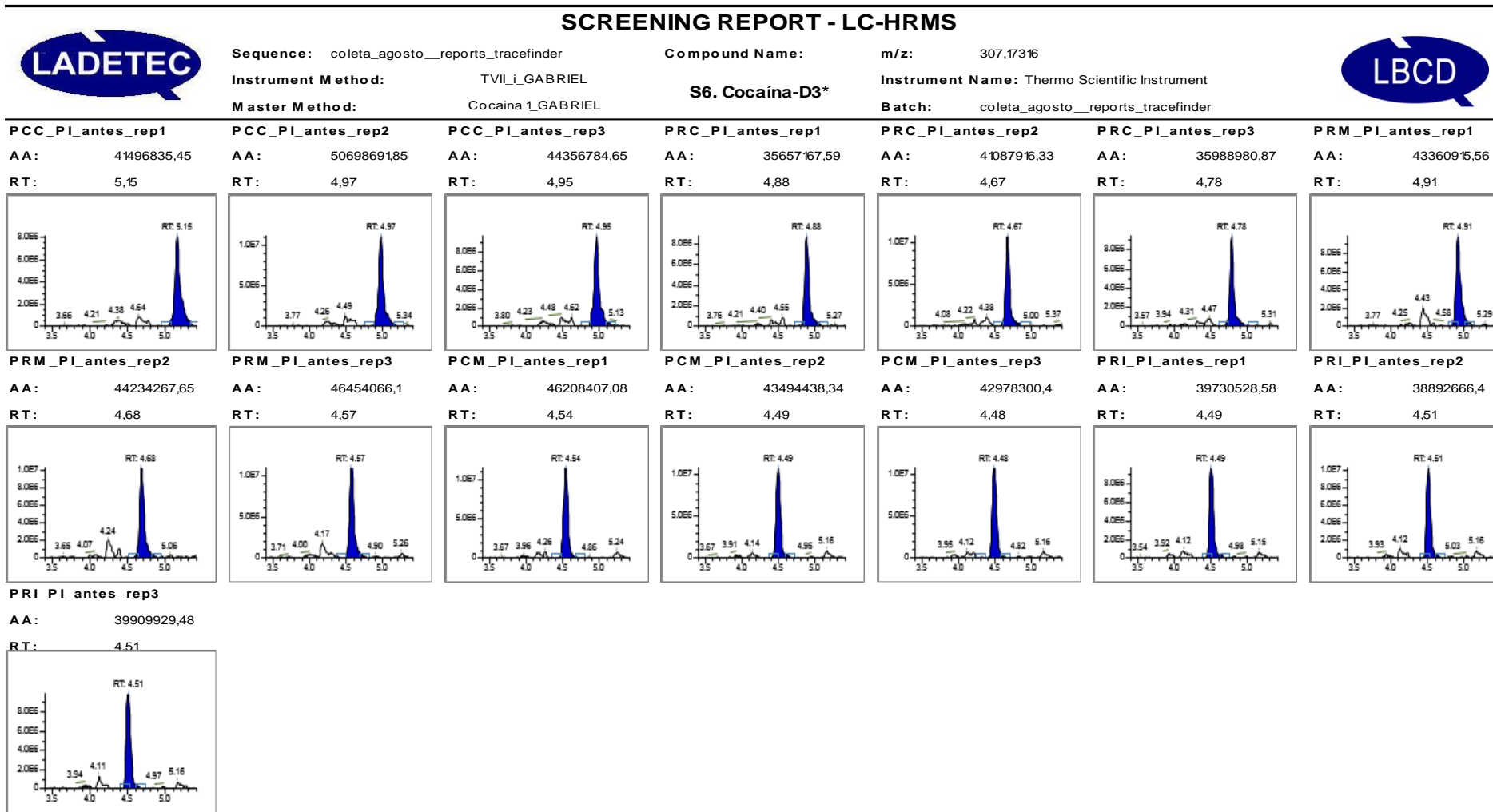
Cromatogramas: campanha de monitoramento - agosto de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



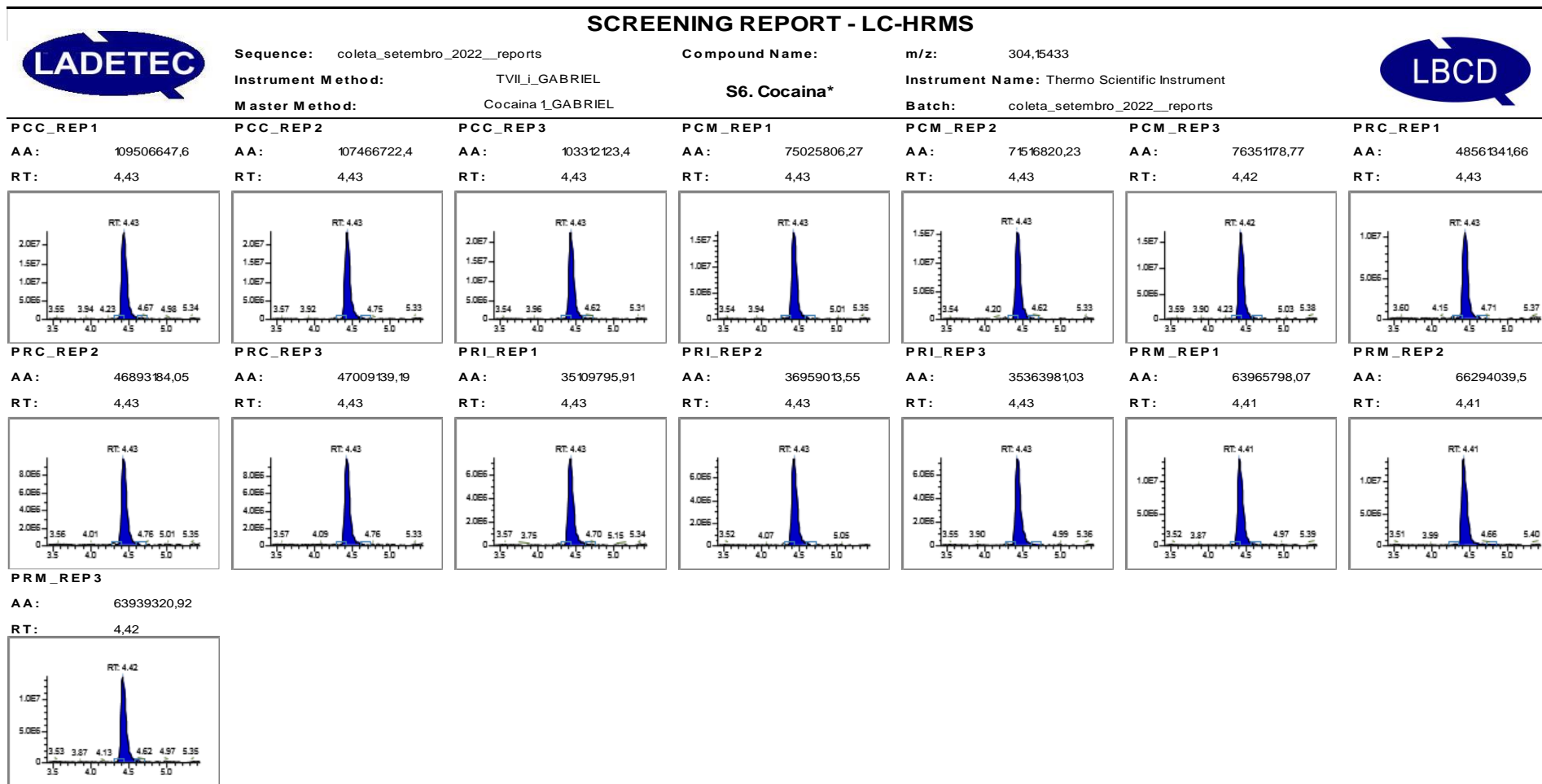
Cromatogramas: campanha de monitoramento - agosto de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



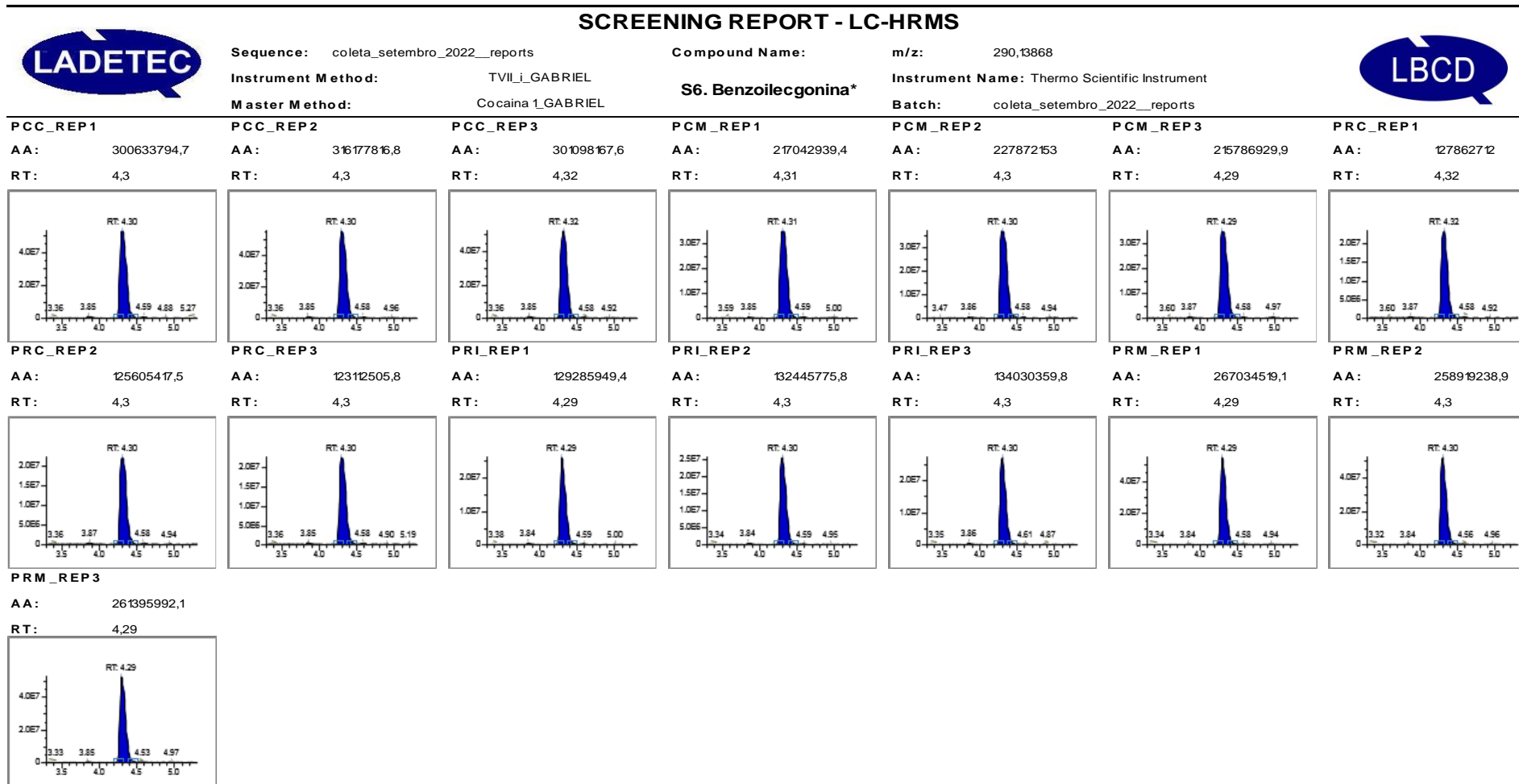
Cromatogramas: campanha de monitoramento - agosto de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - setembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - setembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Sequence: coleta_setembro_2022_reports
Instrument Method: TVIL_GABRIEL
Master Method: Cocaina_1_GABRIEL

Compound Name: S6. Cocaína-D3*

m/z: 307,17316
Instrument Name: Thermo Scientific Instrument
Batch: coleta_setembro_2022_reports

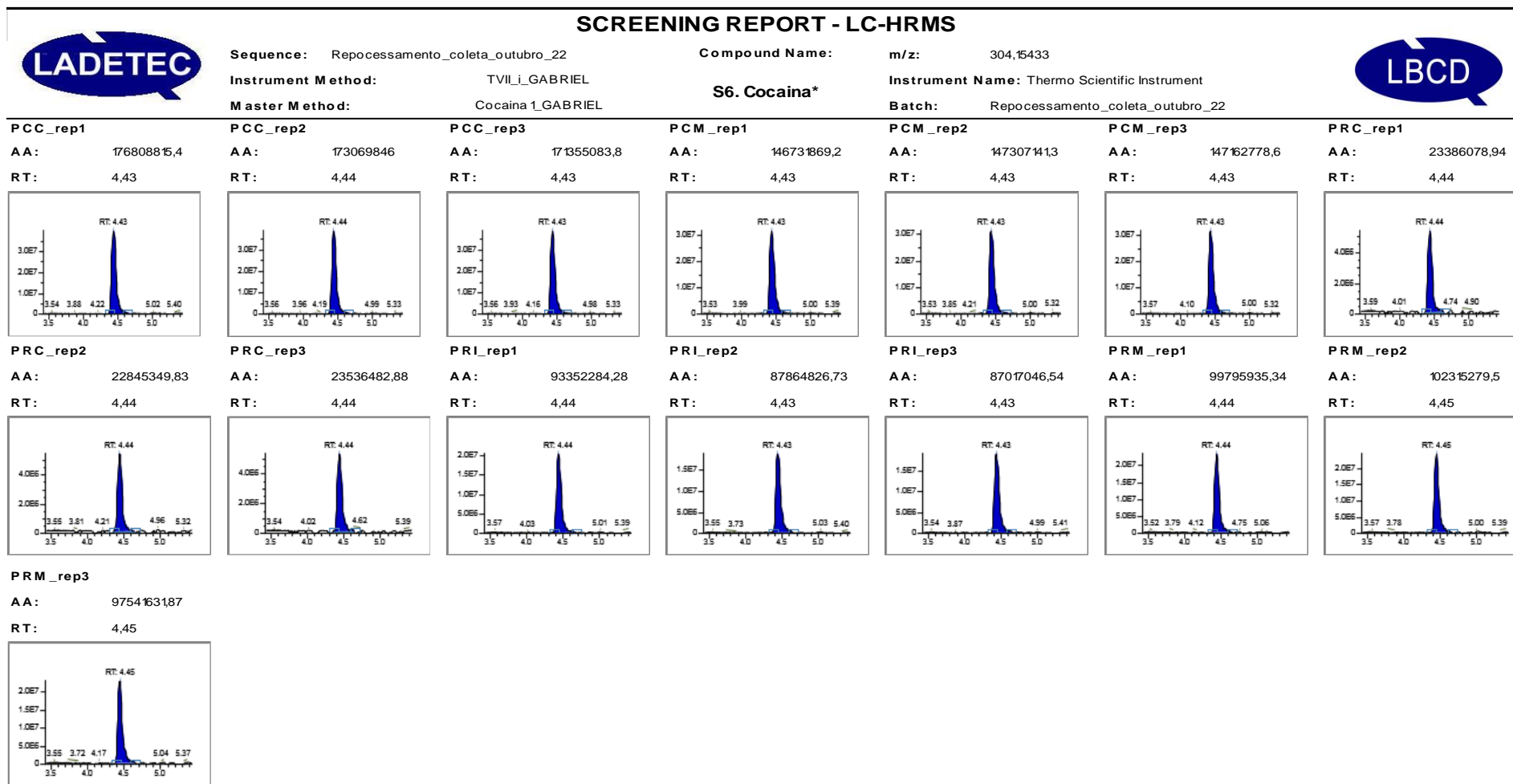


SCREENING REPORT - LC-HRMS

PCC_REP1	PCC_REP2	PCC_REP3	PCM_REP1	PCM_REP2	PCM_REP3	PRC_REP1
AA: 26827196,8 RT: 4,43	AA: 27123873,23 RT: 4,42	AA: 24503183,79 RT: 4,42	AA: 24750138,38 RT: 4,43	AA: 25150914,08 RT: 4,43	AA: 26339724,62 RT: 4,42	AA: 2541497169 RT: 4,43
PRC_REP2	PRC_REP3	PRI_REP1	PRI_REP2	PRI_REP3	PRM_REP1	PRM_REP2
AA: 25306290,05 RT: 4,43	AA: 25773209,56 RT: 4,43	AA: 29688414,14 RT: 4,43	AA: 28692193,35 RT: 4,43	AA: 28749462,11 RT: 4,43	AA: 30208589,43 RT: 4,41	AA: 30660060,47 RT: 4,41
PRM_REP3						
AA: 29325364,94 RT: 4,42						

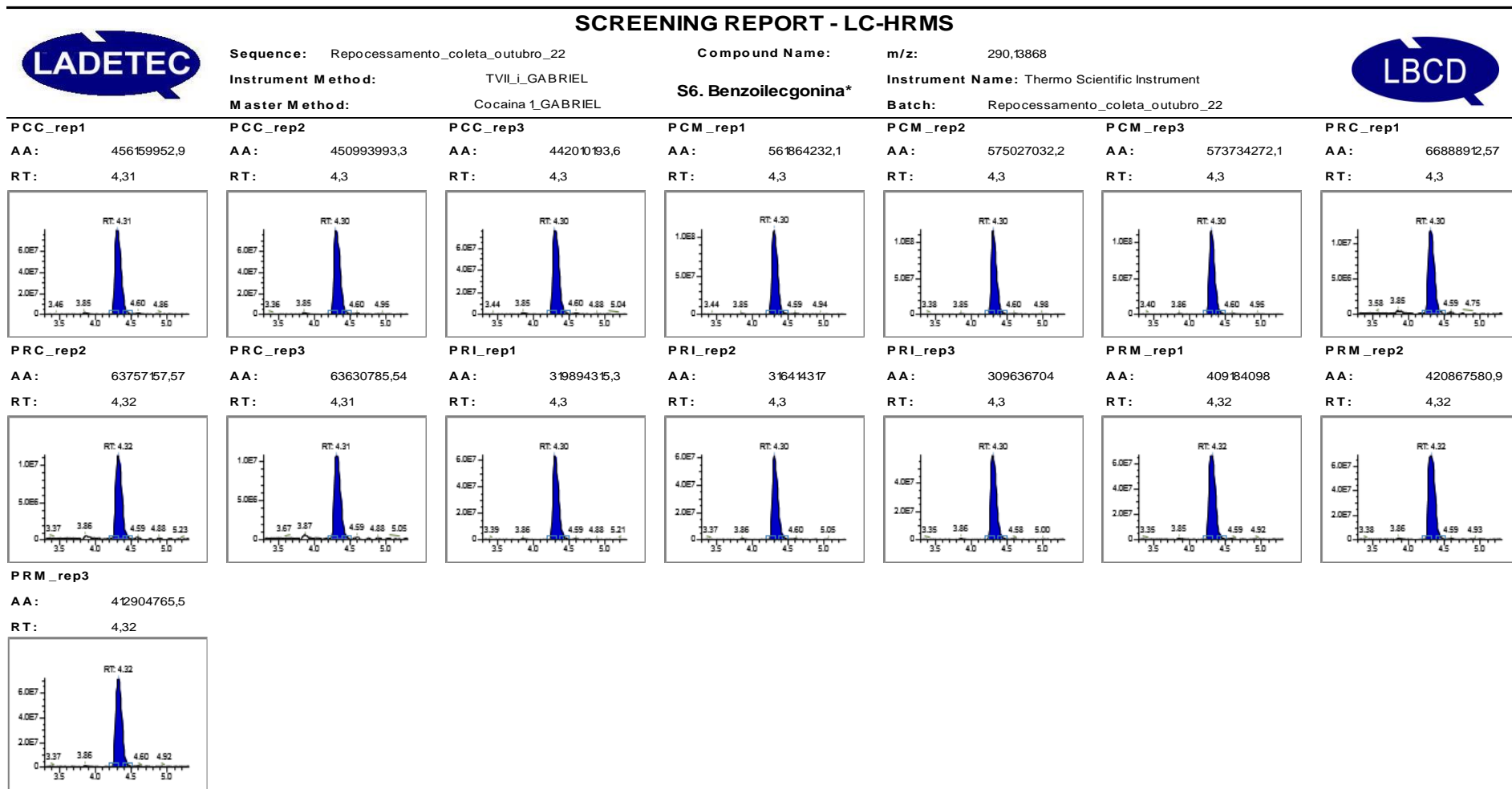
Cromatogramas: campanha de monitoramento - setembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



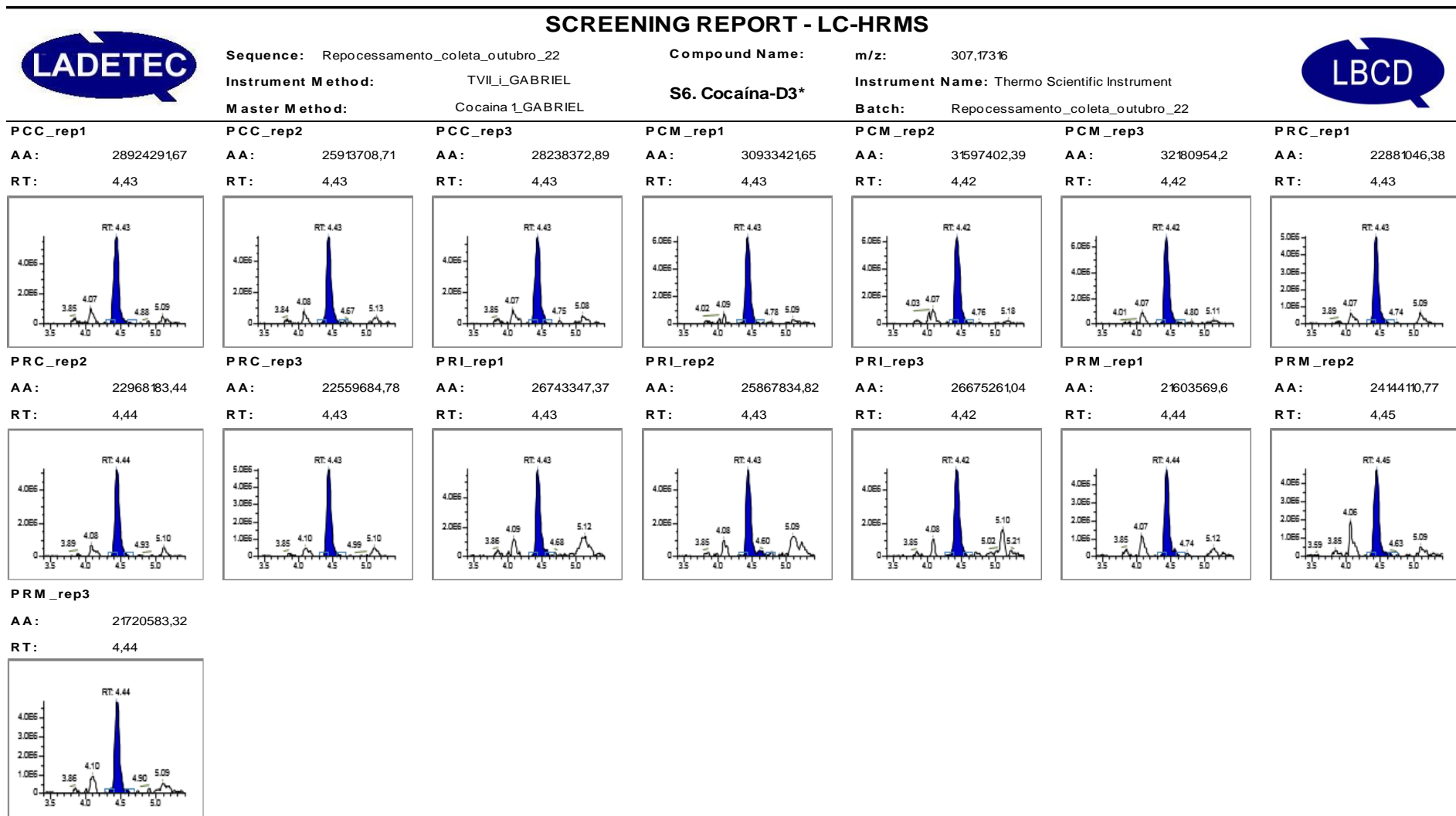
Cromatogramas: campanha de monitoramento - outubro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



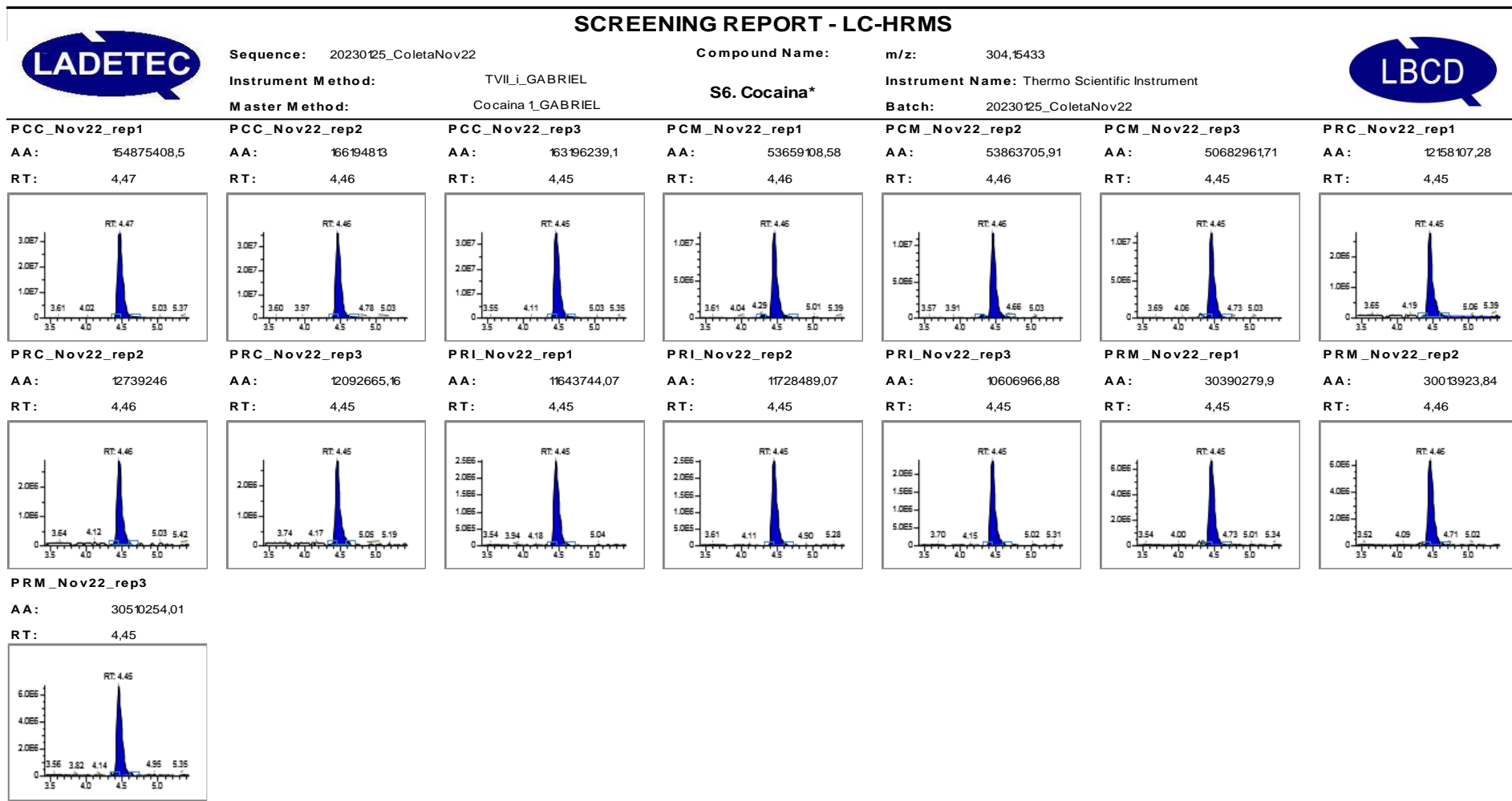
Cromatogramas: campanha de monitoramento - outubro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



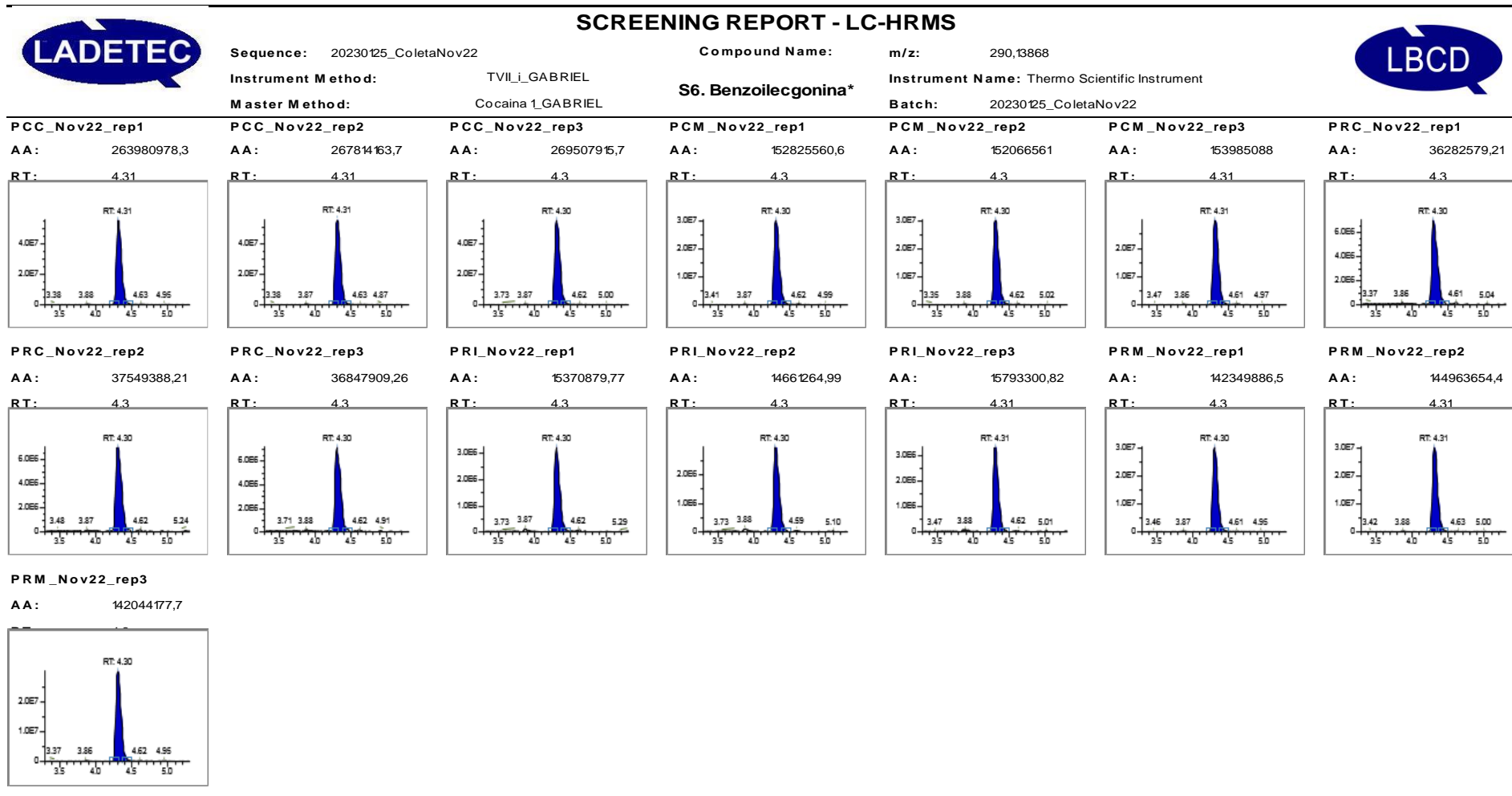
Cromatogramas: campanha de monitoramento - outubro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



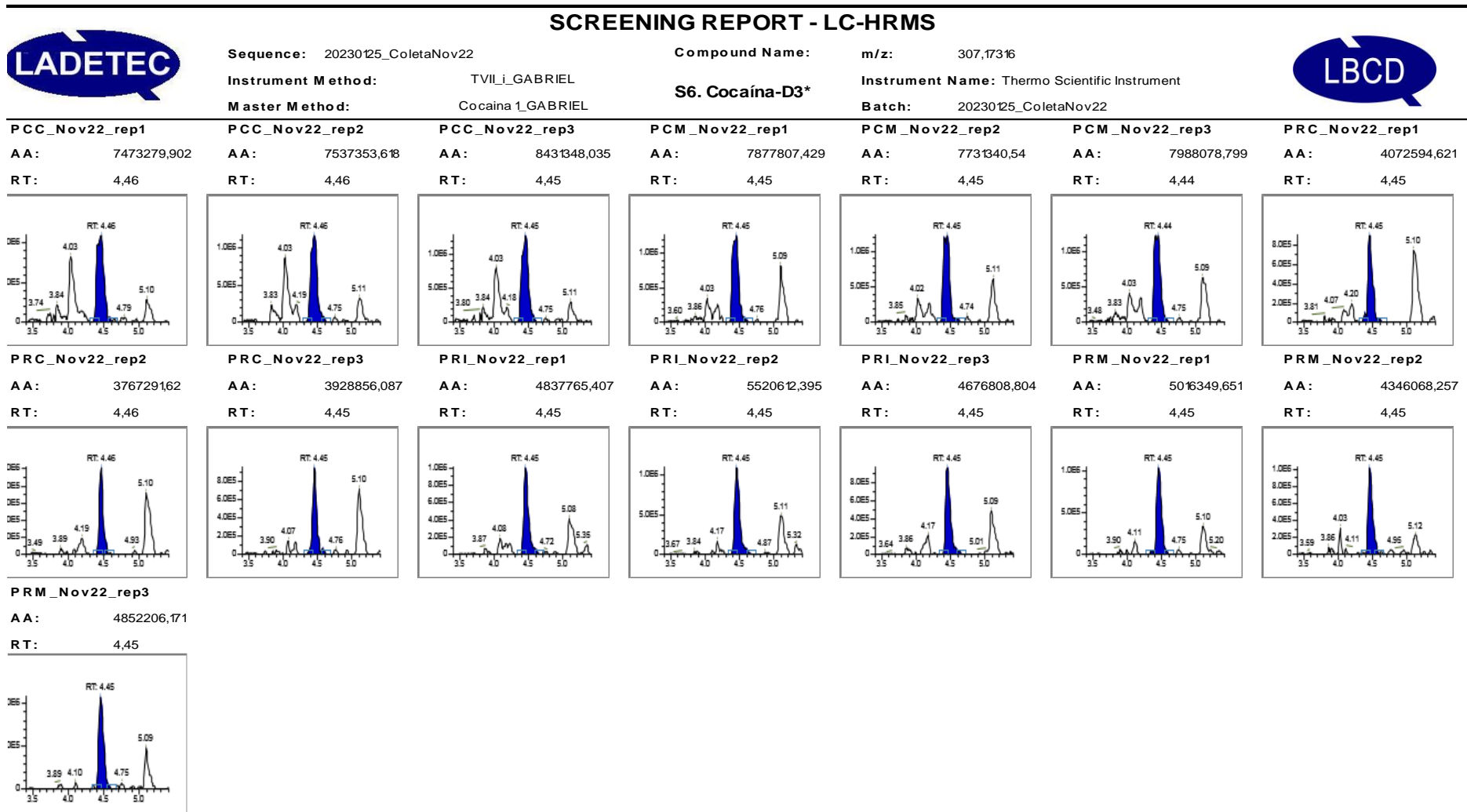
Cromatogramas: campanha de monitoramento - novembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



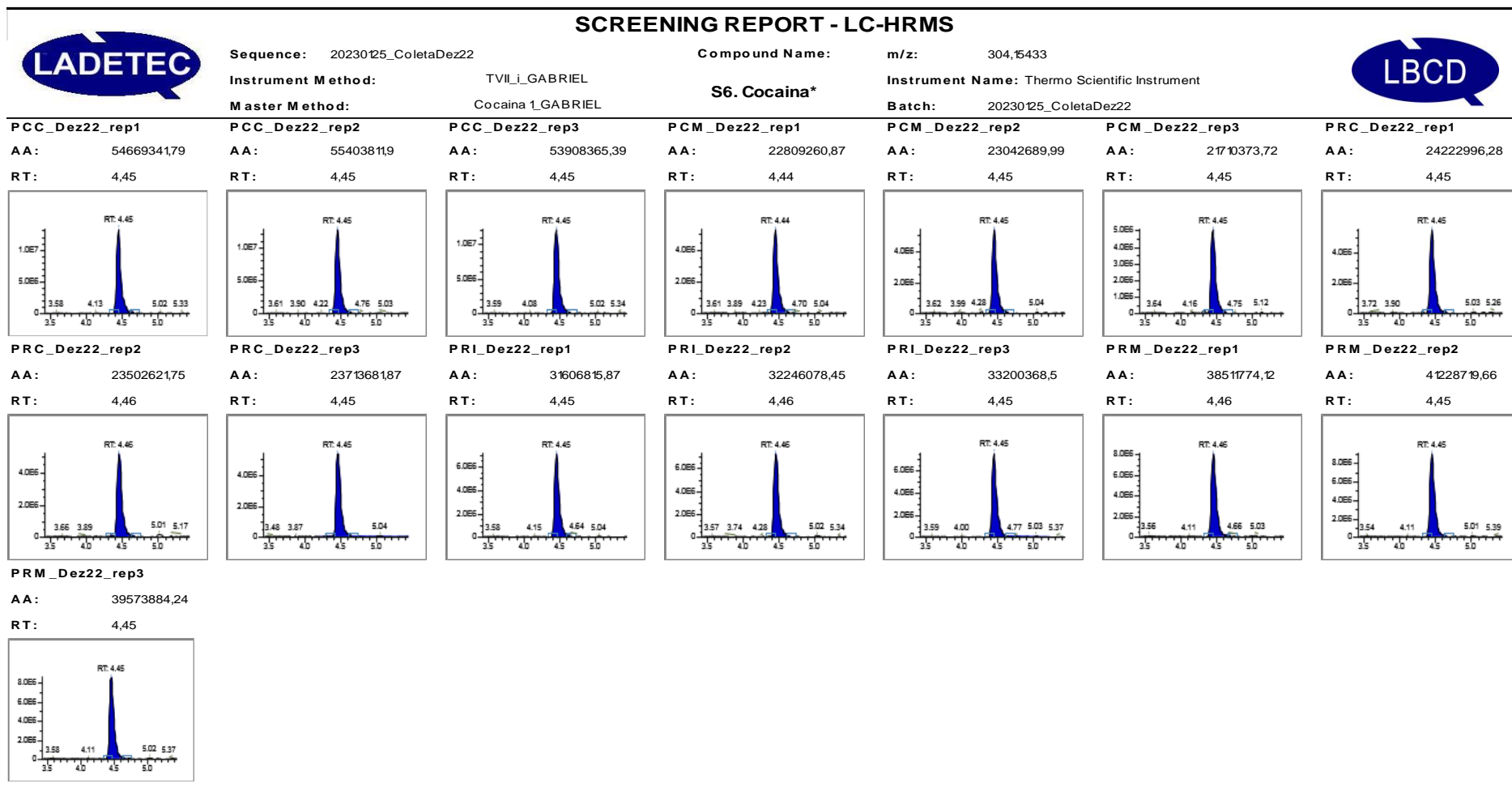
Cromatogramas: campanha de monitoramento - novembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



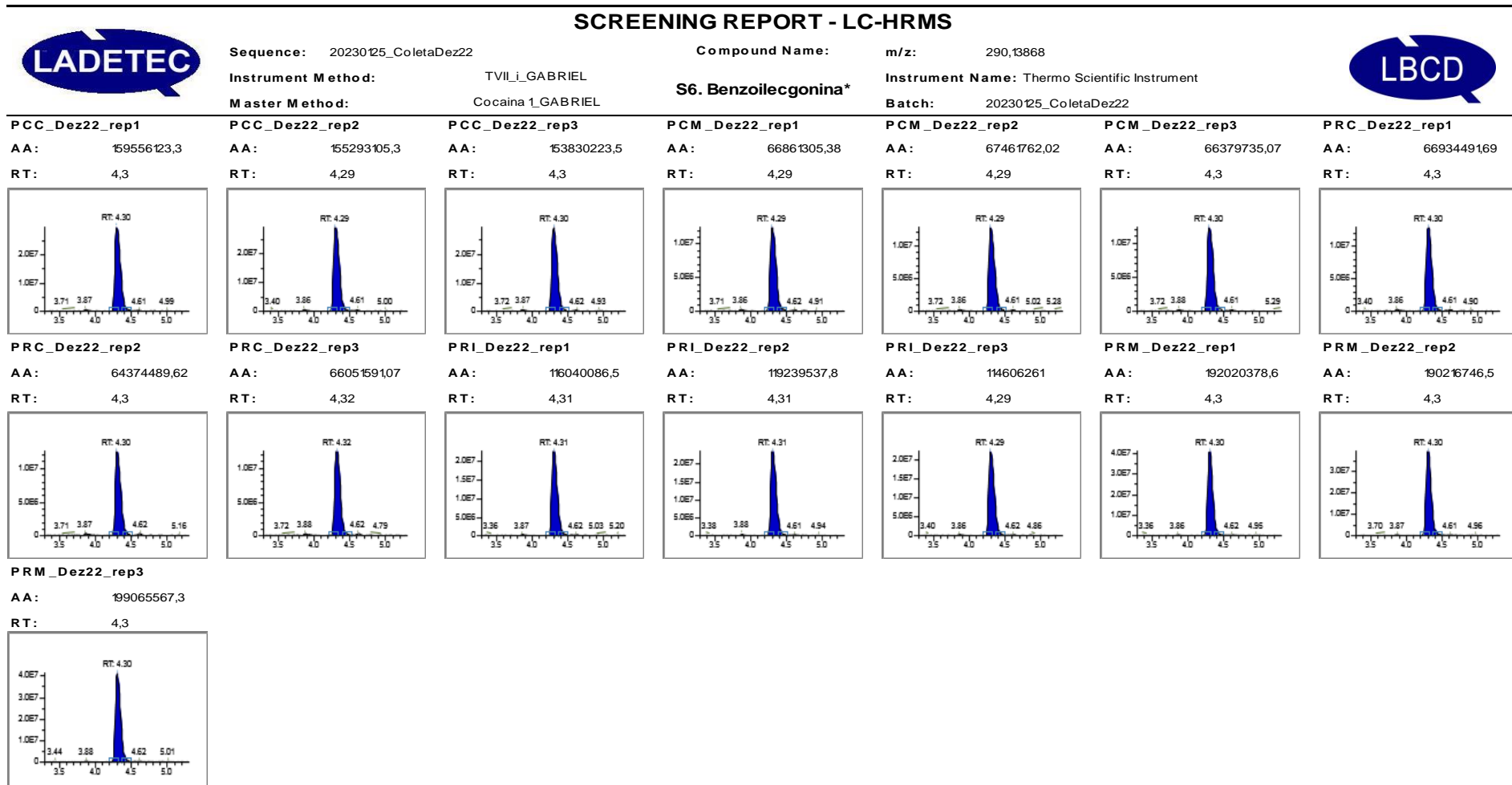
Cromatogramas: campanha de monitoramento - novembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - dezembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - dezembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Sequence: 20230125_ColetaDez22
Instrument Method: TVIL1_GABRIEL
Master Method: Cocaina 1_GABRIEL

Compound Name: m/z: 307,17316
S6. Cocaína-D3*
Instrument Name: Thermo Scientific Instrument
Batch: 20230125_ColetaDez22

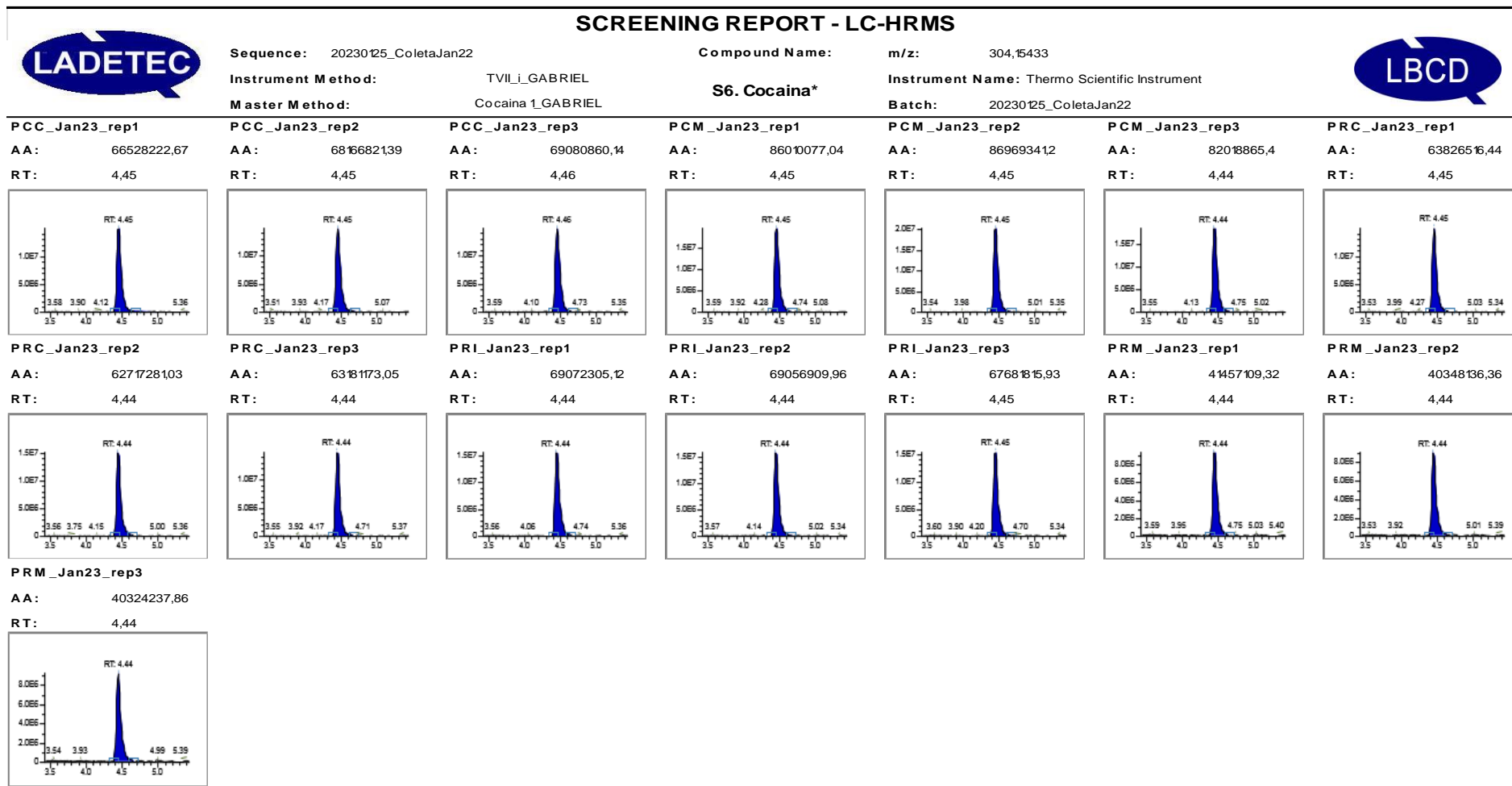


SCREENING REPORT - LC-HRMS

PCC_De222_rep1	PCC_De222_rep2	PCC_De222_rep3	PCM_De222_rep1	PCM_De222_rep2	PCM_De222_rep3	PRC_De222_rep1
AA: 5211984,167 RT: 4,45	AA: 4773060,244 RT: 4,44	AA: 3961768,603 RT: 4,45	AA: 3688302,381 RT: 4,44	AA: 3935104,337 RT: 4,45	AA: 3517038,47 RT: 4,45	AA: 3770352,468 RT: 4,45
PRC_De222_rep2	PRC_De222_rep3	PRM_De222_rep1	PRM_De222_rep2	PRM_De222_rep3	PRM_De222_rep1	PRM_De222_rep2
AA: 4023179,743 RT: 4,45	AA: 4102032,598 RT: 4,45	AA: 4503148,752 RT: 4,45	AA: 5461180,908 RT: 4,45	AA: 4728060,101 RT: 4,45	AA: 4559515,245 RT: 4,44	AA: 4854223,584 RT: 4,45
PRM_De222_rep3	AA: 4685882,497 RT: 4,45					

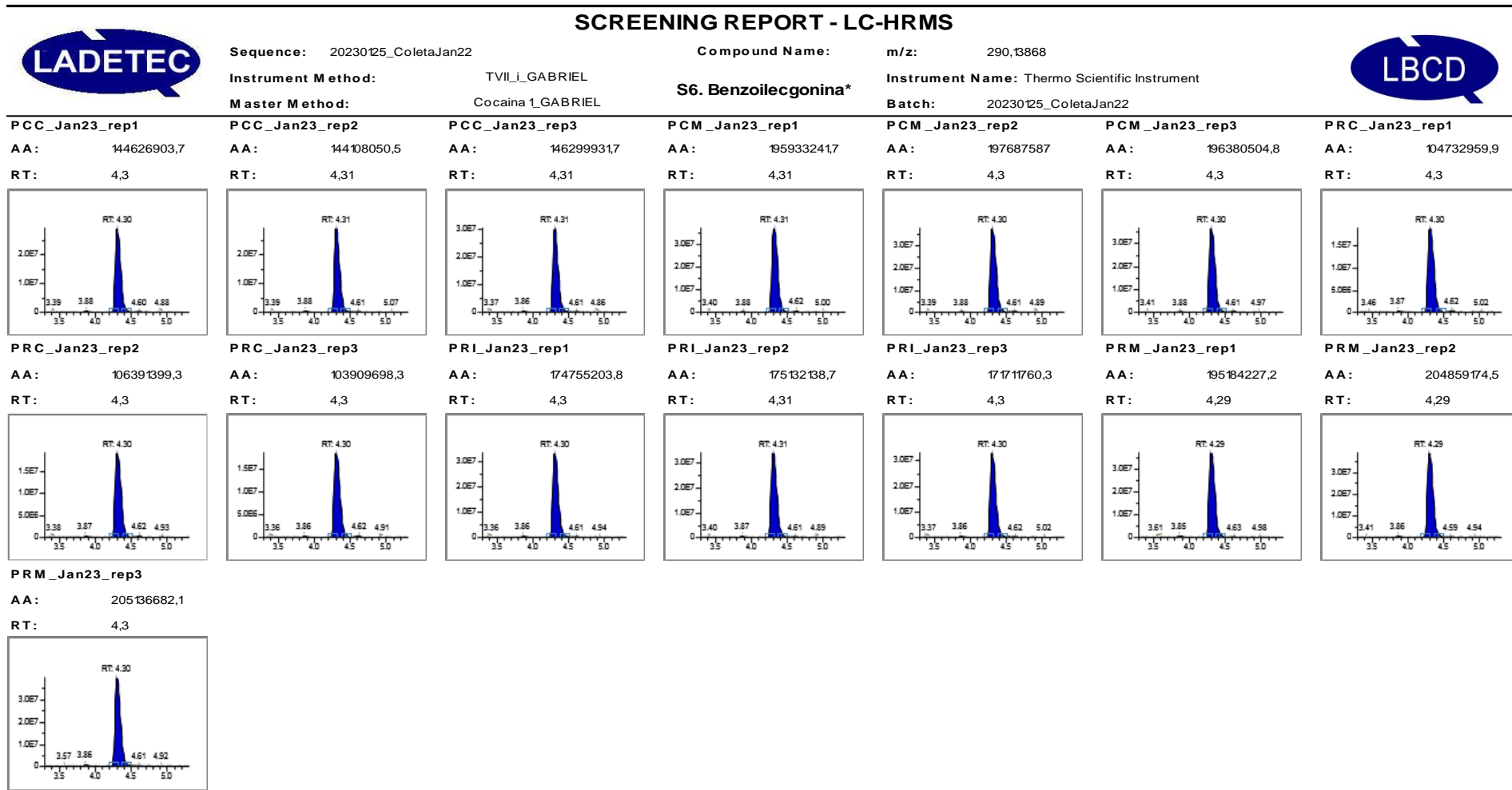
Cromatogramas: campanha de monitoramento - dezembro de 2022. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - janeiro de 2023. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



Cromatogramas: campanha de monitoramento - janeiro de 2023. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.

ANEXO VI
Cromatogramas



SCREENING REPORT - LC-HR/MS

Sequence: 20230125_ColetaJan22

Compound Name: m/z: 307,17316

Instrument Method: TVII_i_GABRIEL

S6. Cocaína-D3*

Instrument Name: Thermo Scientific Instrument

Master Method: Cocaina_1_GABRIEL

Batch: 20230125_ColetaJan22

PCC_Jan23_rep1	PCC_Jan23_rep2	PCC_Jan23_rep3	PCM_Jan23_rep1	PCM_Jan23_rep2	PCM_Jan23_rep3	PRC_Jan23_rep1
AA: 4829022,507	AA: 4281019,679	AA: 501518,085	AA: 4698199,922	AA: 5733092,241	AA: 5055578,138	AA: 4443434,27
RT: 4,44	RT: 4,45	RT: 4,46	RT: 4,45	RT: 4,44	RT: 4,45	RT: 4,44
PRC_Jan23_rep2	PRC_Jan23_rep3	PRI_Jan23_rep1	PRI_Jan23_rep2	PRI_Jan23_rep3	PRM_Jan23_rep1	PRM_Jan23_rep2
AA: 4858311,838	AA: 4325791,839	AA: 4767838,915	AA: 4409174,251	AA: 4694882,625	AA: 5172303,094	AA: 4512627,045
RT: 4,44	RT: 4,44	RT: 4,44	RT: 4,44	RT: 4,44	RT: 4,44	RT: 4,44
PRM_Jan23_rep3						
AA: 4792942,657						
RT: 4,44						

Cromatogramas: campanha de monitoramento - janeiro de 2023. PCC = Canal do Cunha; PCM = Canal do Mangue; PRC = Rio Carioca; PCM = Rio Meriti.