Estudo Ecotoxicológicos do Crack empregando como modelo mexilhões marinhos *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae)

Aline Saturnino Souto Kamimura[1]; Luciane Alves Maranho[1, 2] e Camilo Dias Seabra Pereira[1, 2]

[1] Universidade Santa Cecília - Laboratório de Ecotoxicologia,, Rua Oswaldo Cruz 266, 11045-907 Santos, Brasil.
[2] Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências do Mar, Rua Dr. Carvalho de Mendonça, 144, 11070-102 Santos, Brasil.

Email: alinesouto1988@gmail.com

Resumo: As concentrações de cocaína encontradas em ecossistemas marinhos são de preocupação ambiental por serem compostos bioativos podendo bioacumular ou causar efeitos nocivos a organismos não-alvo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do crack em diferentes fases da vida do mexilhão *Perna perna*, por meio de ensaios fertilização, desenvolvimento embrionário e larval e, estabilidade da membrana lisossomal de hemócitos em organismos adultos. Os resultados foram avaliados através do Trimmed Speraman Karber e ANOVA seguida de Dunnett. O ensaio de fertilização apresentou concentração de efeito a 50% dos gametas expostos $CE_{50\ 1h}$ = 23,53 mg/L, enquanto a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) foi de 10 mg/L, e a Concentração de Efeito Observado (CEO) foi 20 mg/L. Efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e larval foram observados com $CE_{50\ 48h}$ = 16.31 mg/L, CENO = 0,625 mg/L e CEO = 1,25 mg/L. Os efeitos sobre a membrana lisossomal foram observados com CENO = 0,5 µg/L e CEO = 5,0 µg/L. Este estudo demonstrou que o crack causou efeitos em aspectos reprodutivos do mexilhão P. perna em concentrações de cocaína acima das detectadas em ambientes aquáticos. Entretanto, citotoxicidade foi observada em concentrações ambientalmente relevantes, denotando risco à saúde de organismos não-alvos. Nosso estudo tem caráter inovador pelo ineditismo da avaliação ecotoxicológica marinha de uma droga ilícita detectada em zonas costeiras brasileiras e internacionais.
Palavras-chave: Crack, ecossistema marinho, mexilhões, efeitos reprodutivos, citotoxicidade.

Ecotoxicological study of the Crack employing as a mussel Perna perna model*(Bivalvia: Mytilidae)*

Abstract: The concentrations of cocaine found in marine ecosystems are of environmental concern because they are bioactive compounds that may bioaccumulate or cause harmful effects to non-target organisms. The objective of this study was to evaluate the sublethal effects of crack in different phases of the life of the mussel Perna perna, through fertilization, embryonic and larval development, and lysosomal membrane stability of hemocytes in adult organisms. The results were evaluated through the Trimmed Speraman Karber and ANOVA followed by Dunnett. The Fertilizer test showed a concentration of effect at 50% of the exposed gametes EC50 1h = 23.53 mg / L, while the Observed Effect Concentration (NOEC) was 10 mg / L, and Observed Effect Concentration (LOEC) was 20 mg / L. Effects on embryonic and larval development were observed with EC_{50} 48h = 16.31 mg / L, NOEC = 0.625 mg / L and LOEC = 1.25 mg / L. The effects on the lysosomal membrane were observed with NOEC = 0.5 µg / L and LOEC = 5.0 µg / L. This study demonstrated that crack caused effects on reproductive aspects of the *P. perna* mussel at concentrations of cocaine above those detected in aquatic environments. However, cytotoxicity was observed in environmentally relevant concentrations, denoting health risk to non-target organisms. Our

study is innovative because of the novelty of marine ecotoxicological evaluation of an illicit drug detected in Brazilian and international coastal zones.

Keywords: Crack, cocaine, marine ecosystem, mussels, reproductive effects, cytotoxicity

Introdução

A presença de drogas ilícitas no meio ambiente se deve principalmente a liberação de águas residuais provenientes das estações de tratamento de esgotos, em ambientes como rios, lagos e águas costeiras. Quanto aos ambientes de água doce, estudos foram publicados sobre as concentrações atuais de cocaína nas águas superficiais [1-2-3-4-5-6]. Contudo, existem poucos estudos que avaliaram ambientes estuarinos e marinhos [7]. Trabalho de Klosterhaus et al. [8] encontrou cocaína em água do mar (2,4 ng/L), em sedimentos (0,2 ng/L peso seco) e em mexilhões (0,3 ng/L) na região de São Francisco nos Estados Unidos. Recentemente, Pereira et al. [7] encontraram concentrações mais elevadas de cocaína e de benzoilecgonina, principal metabólito humano de cocaína (537,0 ng/L e 20,8 ng/L, respectivamente) em amostras de água do mar na Baía de Santos, São Paulo (Brasil), com valores mínimo e máximo, similares ao encontrado de cafeína (84,4 ng/L e 648,9 ng/L respectivamente).

Segundo Binelli et al. [13], há poucos dados disponíveis sobre os efeitos agudos ou crônicos desses compostos na comunidade aquática. Já efeitos citogenotóxicos foram detectados, em analises realizadas com mexilhão zebra *(Dreissena polymorpha)* expostos a concentrações ambientais de cocaína, benzoilecgonina , e de uma mistura de cocaína, benzoilecgonina, anfetamina, morfina e 3, 4- metilenodioximetam-phetamina [13].

A presença de cocaína e metabólitos em zonas costeiras tem despertado o interesse na elucidação de possíveis efeitos tóxicos desses compostos aos organismos marinhos.

Objetivo

Avaliar a toxicidade da droga ilícita crack empregando como modelo o mexilhão *Perna perna* em diferentes fases da vida (fertilização, embriolarval e citotoxicidade).

Materiais e Métodos

A droga ilícita foi cedida pela 2ª vara criminal do Fórum de Limeira, a partir despacho de Vossa Excelência, Sr. Juiz de Direito Luiz Augusto Barrichello Neto, Proc. N 3012156-28.2013.8.26.0320, Ordem n° 1122/2013. A concentração real de cocaína contida na alíquota

de crack utilizada no presente estudo foi determinada através de análise em Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas (LC-MS/MS) foi de 33,48%.

Os efeitos da crack em diferentes fases da vida de *Perna perna* foram avaliados por meio dos seguintes ensaios: (i) o ensaio de fertilização USEPA, 1991, de Zaroni et al. [11], que mede a capacidade de células espermáticas, após a exposição de crack, para promover a fertilização; (ii) o ensaio de desenvolvimento embrionário e larval segundo ASTM, 1992 com modificações de Zaroni et al., [11], que avalia o desenvolvimento precoce da vida de zigotos expostos ao crack; e (iii) *ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro* (TRCVN) [12], que avalia a estabilidade da membrana lisossômica em hemócitos como um biomarcador de efeito em adultos após a exposição ao crack.

Resultados e Discussão

As concentrações de efeitos nos gametas e no desenvolvimento larval foram encontradas após 1 h (CE_{50} = 23,53 mg/L) e 48 h (CE_{50} = 16,31 mg/L), respectivamente. A maior concentração testada mostrando nenhuma toxicidade aguda (CENO) foi de 10 mg/L, enquanto a menor concentração de efeito observado (CENO) foi 20 mg/L. A CENO relativa ao desenvolvimento embrionário foi de 0,625 mg/L, enquanto a CEO foi de 1,25 mg/L (Tabela 1).

Tabela 1. Análise dos ensaios de toxicidade agudas e crónicas realizadas em mexilhões *Perna perna* expostos as concentrações de crack (mg/L), expressos em CENO, CEO e CE_{50}.

Respostas	**CE_{50} mg/L**	**CENO mg/L**	**CEO mg/L**
Fertilização inibida (1h)	23,54	10	23,33
Desenvolvimento anormal de embrião-larva (48h)	16,32	1,12	2,25

CEO observado na estabilidade lisossomal de hemócitos através da aplicação do ensaio TRVCN foi de 5 µg/L, enquanto CENO foi de 0,5 µg/L (Tabela 2).

Tabela 2 - Citotoxicidade de crack em hemócitos de mexilhões *Perna perna*. Expressos valores de CENO e CEO.

Resposta (horas)	CENO µg/L	CEO µg/L
Estabilidade da membrana lisossomal	0,5	5

Os nossos resultados mostraram efeitos adversos (citotoxicidade) na ordem de 5 µg/L de crack ou 2,02 µg/L de cocaína (concentração real), destacando o risco ecológico de cocaína e seus subprodutos para ambientes marinhos. Binelli et al. (2012) observou-se um aumento significativo no número de células apoptóticas em *D. polymorpha* expostas a 220 ng/L de cocaína durante 24 horas. De acordo com a orientação da Agência Europeia de Medicamentos sobre a Avaliação Prévia de Autorização de Medicamentos para Uso Humano-EMEA [14], um Quociente de Risco (MEC / PNEC) superior a 1, denota risco e uma avaliação preliminar poderia ser realizada empregando a concentração máxima de cocaína encontrada na Baía de Santos (MEC) de 0,537 µg/L [7] e a concentração sem efeito previsto (PNEC = CENO / 10) de 0,020 µg/L (com base na concentração de cocaína medido no nominal concentração de 0,5 µg/L de crack). O coeficiente de risco calculado pela proporção MEC/ PNEC seria 26,58 denotando um risco elevado.

As pesquisas atuais sobre toxicidade ambiental de drogas ilícitas evidenciam a necessidade de um tratamento eficiente e adequado de compostos bioativos antes das descargas de águas residuais em ambientes de água doce e marinhos [15]. A toxicidade dos subprodutos da cocaína e os efeitos deletérios na biota marinha destacam a necessidade de monitorar regularmente a contaminação das águas costeiras por esses compostos, avaliando também a implementação e o funcionamento adequado das estações de tratamento de esgotos.

Conclusão

Nosso estudo demonstrou efeitos tóxicos sobre diferentes estágios de vida do mexilhão *P. perna*, com ênfase a citotoxicidade em concentrações ambientais e forneceu novas evidências sobre os riscos ecológicos da cocaína e seu subproduto, o crack, para os ecossistemas marinhos. Futuros estudos avaliarem a bioacumulação e os efeitos deletérios do composto estudado em maiores tempos de exposição (crônico), fator primordial para avaliação de riscos ambientais de substâncias bioativas.

Referências Bibliográficas

1. BAKER, D.R.; OCENÁSKOVÁ, V.; KVICALOVA, M.; KASPRZYK-HORDERN, B. Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter further developments in sewage epidemiology. Environ. Int. 48, 28–38. 2012.
2. BAKER, D.R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments. Sci. Total Environ. 454-455, 442–456. 2013.
3. CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; FANELLI, R. Illicit drugs in the environment: occurrence, analysis, and fate using mass spectrometry. Oxford: Wiley-Blackwell. 2011.
4. HERNÁNDEZ, F.; IBÁÑEZ, M.; BOTERO-COY, A.M.; BADE, R.; BUSTOS-LÓPEZ, M.C.; RINCÓN, J.; MONCAYO, A.; BIJLSMA, L. LC-QTOF MS screening of more than 1,000 licit and illicit drugs and their metabolites in wastewater and surface waters from the area of Bogotá, Colombia. Anal Bioanal Chem (21): 6405-16. 2015.
5. METCALFE, C.; TINDALE K, L.I.H.; RODAYAN, A.; YARGEAU, V. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. Environ Poll *158* (10): 3179–85. 2010.
6. VAN NUIJS, A.L.N.; PECCEU, B.; THEUNIS, L.; DUBOIS, N.; CHARLIER, C.; JORENS, P.G.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment. Water Res 43 (5): 1341–9. 2009.
7. PEREIRA, C.D.S.; MARANHO, L.A.; CORTEZ, F.S.; PUSCEDD, F.H.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO, D.A.; CESAR, A., GUIMARÃES, L.L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. Science of the Total Environment 548–549, 148–154. 2016.
8. KLOSTERHAUS, S.L.; GRACE, R.; HAMILTON, M.C.; YEE, D. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface water, sediments, and mussels in an urban estuary. Environ. Int. 54, 92–99. 2013.
9. MAZUR, W. A. Avaliação de risco ambiental do fármaco Paracetamol na Baía de Santos, SP. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Santa Cecília, Santos – SP.
10. USEPA – United States Environmental Protection Agency. Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs). Disponível em: http://www.epa.gov/ppcp/faq.html#othersci. 1991.
11. ZARONI, L.P.; ABESSA, D.M.S.; LOTUFO, G.R.; SOUSA, E.C.P.M.; PINTO, Y.A. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 74, 793 e 800. 2005.
12. LOWE, D. M.; SOVERCHIAB, C. & MOORE, M. N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic Toxicology, v. 33, p. 105-112, 1995.
13. BINELLI, A.; PEDRIALI, A.; RIVA, C.; PAROLINI, M. (2012). Illicit drugs as new environmental pollutants: Cytogenotoxic effects of cocaine on the biological model *Dreissena polymorpha*. Chemosphere 86 (9): 906–911.
14. EMEA - European Medicines Agency Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. 2006.
15. MARANHO, L . A.; PEREIRA, C. D. S. Chapter 33. Pharmaceutical and personal care products (ppcps) in the environment: Latin American occurrences, adverse effects and perspectives. In: Araújo, C.V.M., Shinn, C. (Eds.), Ecotoxicology in Latin America. Nova Science Publishers, pp. 537–549. 2017.