ISSN: 2594-6153

Efeitos adversos de crack/cocaína na fertilização do mexilhão marinho *Perna perna* em diferentes cenários de acidificação oceânica

Júlia Alves Luzzi[1], Lorena da Silva Souza[2], Camilo Dias Seabra Pereira[1]

[1]Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos-SP, Brasil
[2]Universidade de Cádiz (UCA) – Faculdade Ciências Ambientais e Marinhas, Cádiz, Espanha

E-mail: julialuzzi@gmail.com

Resumo: Em resposta à crescente carga atmosférica de CO_2 e ao aumento da captação oceânica, os oceanos estão passando por mudanças físicas e biogeoquímicas: aquecimento da superfície, oxigênio reduzido e uma redução nos níveis de saturação de carbonato de cálcio e pH. As mudanças no pH e na composição química da água do mar podem modificar a especiação dos contaminantes, devido à especiação do elemento em grande parte dependente dos parâmetros físico-químicos (salinidade, pH, potencial redox). A hipótese deste trabalho é que a acidificação oceânica provocará maior toxicidade de substâncias bioativas para organismos marinhos devido aos efeitos combinados da droga e baixo pH (de 8,0 a 6,5) na reprodução do mexilhão marinho *Perna perna*. A taxa de fertilização foi conduzida para avaliar os efeitos das concentrações de crack-cocaína (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L) e sua associação com a variação dos valores de pH. CENO e CEO foram calculados a partir dos resultados do ensaio de fertilização, sendo 25 mg/L a concentração de efeito não observado nos pHs 7,5 e 6,5 e 50 mg/L a concentração de efeito observado. Não foram observados efeitos nas concentrações de crack/cocaína quando expostos aos pHs 8,3; 8,0 e 7,0. Nossos resultados evidenciam que os gametas de *P. perna* sofrem efeitos mais contundentes quando expostos à concentração de drogas ilícitas e reduções de pH.

Palavras-chave: Acidificação oceânica; Crack/cocaína; Mexilhão; *Perna-perna*.

Adverse effects of crack / cocaine in the fertilization of the sea mussel *Perna perna* in different scenarios of ocean acidification

Abstract: In response to the increasing atmospheric load of CO_2 and increasing marine uptake, oceans are undergoing physical and biogeochemical changes: surface and deep water warming, reduced underground oxygen, and a reduction in calcium carbonate saturation and pH levels. Changes in pH and seawater chemistry caused by increased CO_2 may modify the speciation of compounds due to largely dependent on physicochemical parameters (salinity, pH, redox potential). The hypothesis of this work is that oceanic acidification will cause greater toxicity of illicit drugs to non-target marine organisms due to the combined effects of crack-cocaine and low pH (from 8.0 to 6.5) on the reproduction of *Perna perna* marine mussel. The fertilization rate was conducted to evaluate the effects of crack cocaine concentrations (6.25; 12.5; 25; 50 and 100 mg / L) and their association with the variation of pH values. NOEC and LOEC were calculated from the results of the fertilization rate assay, with 25 mg/L of non-observed effect concentration at pH 7.5 and 6.5 and 50 mg/L of low observed effect concentration. No effects on crack-cocaine concentrations were observed when exposed to pH 8.3; 8.0 and 7.0. Our results show that *P. perna* gametes react to acidification when exposed to crack and cocaine concentration and pH reductions.

Keywords: Ocean acidification; Crack-cocaine; Mussel; *Perna-perna*.

Introdução

O consumo de drogas ilícitas, como maconha, cocaína, anfetamina, entre outros, vem aumentando em decorrer dos anos e tem o seu consumo comparado ao das drogas terapêuticas, criadas para serem persistentes, ou seja, demoram para se degradarem no ambiente [1-2]. Como os medicamentos em geral, as drogas ilícitas persistem na urina dos seus consumidores, sendo lançadas nas redes de esgotos [3]. Com isso, estudos recentes revelaram a presença de cocaína e seus derivados em altas concentrações na costa brasileira (Santos-SP) [4].

Os medicamentos em geral têm uma característica específica em relação aos seus valores de pKa (logaritmo negativo da constante de ionização). Quando o fármaco tem um pH semelhante ao pKa, ele é encontrado em 50% na sua forma iônica e 50% na forma molecular. A cocaína é uma droga básica, quando combinada com bicarbonato de sódio se converte na sua forma iônica (crack-cocaína), um composto alcaloide, com a característica incomum de ser altamente hidrofílica ou lipofílica [5], em outras palavras, o pH do meio influencia a forma como um composto vai ser absorvido pelo organismo.

Nos últimos anos, houve um aumento significativo na emissão de CO_2, originado de ações antrópicas, como a queima de combustíveis fósseis, e de forma natural, como erupções vulcânicas. No meio aquático, o CO_2 passa por transformações químicas dando origem ao ácido carbônico (H_2CO_3), que rapidamente se dissocia produzindo íons bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ [6]. Desta forma, o gás carbônico e sua subsequente dissociação, contribui para a acidificação dos oceanos, devido ao aumento em íons H^+. Atualmente, o pH médio da água do mar é de 8,1, esse número já é 0,1 unidades de pH menor desde 1750 [7-8].

A acidificação dos oceanos pode causar diversos efeitos nos organismos marinhos, como estresse fisiológico, alterações nas taxas de calcificação, reprodução e crescimento, principalmente em corais e moluscos [9-10]. A calcificação dos organismos se dá através da absorção de carbonato de cálcio ($CaCO_3$), originado da reação química da dissolução do CO_2 em ambiente marinho.

Baseando-se nas afirmações acima, a hipótese deste trabalho é que a acidificação oceânica altera a toxicidade da droga ilícita crack/cocaína e causa efeitos mais severos no sucesso reprodutivo do molusco bivalve *P. perna*.

Objetivos

ISSN: 2594-6153

O presente estudo tem como objetivo avaliar as concentrações de crack/cocaína que podem causar efeito na taxa de fertilização de mexilhões *Perna perna* e se alterações de pH aumentam a toxicidade dessa droga ilícita.

Material e Métodos

O sistema de injeção de CO_2 Apex Fusion é um equipamento que simula o processo de acidificação oceânica controlando o pH de cada câmara teste. Por meio de eletrodos (escala NBS) conectados a um computador, válvulas solenoides são acionadas quando o pH aumenta 0,01 unidade acima do pH predeterminado, liberando CO_2, e as mesmas são fechadas assim que o pH alvo é atingido.

A partir desse sistema foram acidificadas a solução estoque de crack/cocaína (100 mg/L) e a água reconstituída (salinidade 35) em béqueres de 1L, para cada valor de pH (8,0; 7,5; 7,0 e 6,5). A água reconstituída é preparada em laboratório a partir de água destilada misturada com sal marinho sintético (Sea Red®) e depois filtrada em malha de 0,45µm. Além dos valores de pH citados acima, foi empregado um pH controle (pH 8.3), onde a água reconstituída sem nenhuma adição de CO_2 foi utilizada para a preparação das diluições.

O ensaio de fertilização, seguiu o protocolo ASTM 1992 [11] adaptado por Zaroni et al. [12]. Espécimes adultos de *P. perna* foram induzidos a liberação dos gametas. Posteriormente machos e fêmeas foram colocados em placas de Petri e seus gametas coletados separadamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Os espermatozoides foram expostos nas diferentes concentrações de crack/cocaína (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L) por 60 minutos. Depois desse período, uma suspensão contendo aproximadamente 2000 óvulos foi adicionada aos tubos de ensaio. Após 40 minutos de adicionado os óvulos, o teste é encerrado acrescentando 0,5mL de formaldeído (pH 7,0) em cada réplica. Os primeiros 100 ovos de cada réplica foram analisados e a fertilização foi identificada pela observação da ocorrência da membrana de fertilização ou das primeiras divisões celulares. O teste é considerado aceito quando há pelo menos 80% de fertilização no controle.

Resultados

Os resultados obtidos no ensaio da taxa de fertilização do mexilhão *P. perna* são apresentados na figura 1. Foi demonstrado que nos valores de pH 8,3; 8.0 e 7,0, as concentrações de crack/cocaína não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Já nos pHs 7,5 e 6,5, as concentrações mais altas de crack/cocaína (50 e 100 mg/L)

apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na taxa de fertilização quando comparados ao controle. Foi possível detectar os valores da concentração de efeito não-observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO) nos pHs 7,5 e 6,5. Sendo a CENO encontrada na concentração de 25 mg/L e a CEO nas concentrações de 50 e 100 mg/L de crack/cocaina em ambos os pHs.

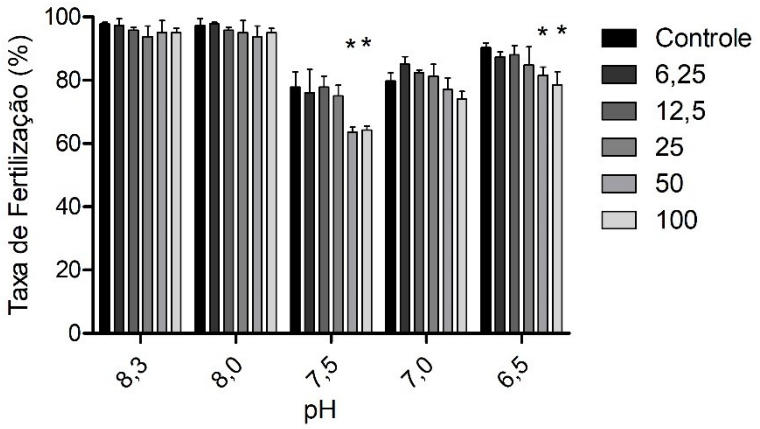

Figura 1. Taxa de fertilização (%) do mexilhão marinho *P. perna* exposto a diferentes concentrações de crack/cocaina em cenários de acidificação. (*) diferença significativa com o controle ($p < 0,05$).

Discussão

A partir dos resultados dos controles, observa-se uma tendência de diminuição da taxa de fertilização a partir do pH 7,5. Barros et al. [13] demonstraram que a porcentagem de ovos fertilizados de *C. gigas* foi substancialmente reduzida, quando o valor de pH diminui 0,7 em relação ao valor original comparado aos outros tratamentos. Já Parker et al. [14] mostraram que em seu menor valor de pH testado, a taxa de fertilização estava abaixo de 80%. Esses achados podem apoiar a hipótese proposta por Kurihara et al. [15] que a acidificação da água do mar afetaria o pH intracelular do esperma e alteraria a motilidade, fertilização e o desenvolvimento embrionário.

A toxicidade do crack também foi observada somente partir do pH 7,5 em gametas expostos às concentrações 50 e 100 mg/L, corroborando com Munari et al. [16], que observaram larvas do bivalve *Ruditapes philippinarum* com sensibilidade aumentada a outra substância biotiva (diclofenaco) quando expostas a pH reduzido, apresentando anomalias e diferenças significativas no desenvolvimento das conchas.

Conclusão

Gametas de mexilhão marinho são afetados pela redução de pH e tem sensibilidade aumentada a drogas como o crack em cenários de acidificação oceânica.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Souza. L.S. agradece ao ERASMUS MUNDUS pela bolsa de doutorado. Pereira C.D.S. agradece ao CNPq pelo financiamento (Projeto #409187/2016-0) e bolsa de produtividade em pesquisa.

Referências

1. Zuccato, E, Castiglioni S. Illicit Drugs in the Environment. Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences 367(1904):3965–78. 2009.
2. Mulroy A. When the cure is the problem. Water Environment Technology. 2001. 13(2): 32- 36. 2001.
3. Pal R, et al. Illicit Drugs and the Environment — A Review. Science of the Total Environment 463–464:1079–92. 2013.
4. Pereira C.D.S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. Science of the Total Environment, 548-549, pp.148–154. 2016.
5. Florence A.T, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. Pharmaceutical Press, pp.286–290. 2006.
6. Millero FJ, et al. Solubility of oxygen in the major sea salts as a function of concentration and temperature. Marine chemistry, 78(4), 217-230. (2002).
7. Raven J, et al. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. The .
8. Bernstein L, et al. Summary for Policymakers of the Synthesis Report. In: Allali, A. (Ed.), Climate Change, 2007: Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, p. 22. 2007.
9. Gazeau F, et al. Impact of elevated CO2 on shellfish calcification. Geophysical Research Letters, 34(7). 2007.
10. Doney SC, et al. "Ocean acidification: the other CO_2 problem." 2009.
11. ASTM (1992), Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. E 724-89. In: Annual book of ASTM Standards. Philadelphia. [Section 11. Vol. 11.04].
12. Zaroni LP, et al. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for Perna perna (Linnaeus, 1758). Bulletin of environmental contamination and toxicology, 74(4), 793-800. (2005).
13. Barros P, et al. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 440, p. 200-206, 2013.
14. Parker LM, et al. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). Global Change Biology, 15(9), 2123-2136. (2009).
15. Kurihara H, Shirayama Y. Effects of increased atmospheric CO2 on sea urchin early development. Marine Ecology Progress Series, 274, 161-169. (2004).
16. Munari M, et al. Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage: a tale from the clam *Ruditapes philippinarum*. Chemosphere 160, 293 -302 (2016).