ISSN: 2594-6153

Efeitos neurotóxicos do crack-cocaína combinado a cenários de acidificação oceânica no mexilhão marinho *Perna perna*

Júlia Alves Luzzi[1], Lorena da Silva Sousa[2], Camilo Dias Seabra Pereira[1,3]

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

E-mail: julialuzzi23@gmail.com

Resumo: Os oceanos estão passando por mudanças físicas e biogeoquímicas em resposta à crescente carga atmosférica de CO_2 e ao aumento da captação oceânica, como 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, interferindo na sua biodisponibilidade e toxicidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito subletal da droga ilícita crack em diferentes concentrações (0,5;5;50 µg/L) combinada com a acidificação oceânica por adição de CO_2 em valores de pH de 8,1; 7,5; 7,0; 6,5 e 6,0. Para tanto, foi realizada a análise do biomarcador de efeito neurotóxico acetilcolinesterase (AChe) em mexilhões da espécie *Perna perna*. Observou-se, preliminarmente, a inibição da AChe após exposição ao crack nos pH 7,5, 7,0 e 6,5, demonstrando efeito combinando de crack (cocaína) e redução de pH, o que pode ser observado em futuros cenários de acidificação em regiões costeiras contaminadas por drogas ilícitas.
Palavras-chave: Acidificação oceânica; Crack/cocaína; Acetilcolinesterase; contaminação marinha.

Neurotoxic effects of crack-cocaine combined with ocean acidification scenarios in marine mussel *Perna perna*

Abstract: The oceans are undergoing physical and biogeochemical changes in response to the increasing atmospheric CO2 load and increased ocean uptake, such as surface warming, reduced oxygen and a reduction in calcium carbonate and pH saturation levels. Changes in the pH and chemical composition of seawater can modify the speciation of contaminants, interfering with their bioavailability and toxicity. The present study aimed to evaluate the sublethal effect of the illicit drug crack-cocaine at different concentrations (0.5; 5; 50 µg / L) combined with ocean acidification by CO_2 at pH values of 8.1; 7.5; 7.0; 6.5 and 6.0. For this purpose, an analysis of the biomarker of neurotoxic effect acetylcholinesterase (AChe) was performed on mussels *Perna perna*. The inhibition of AChe after exposure to crack at pH 7.5, 7.0 and 6.5 was preliminarily observed, demonstrating a combined effect of crack-cocaine and pH reduction, which can be observed in future scenarios of acidification in coastal zones contaminated by illicit drugs.
Keywords: Ocean acidification; Crack/cocaine; Acetylcholinesterase; AChe; Enzyme.

Introdução

Os níveis atmosféricos de dióxido de carbono (CO_2) estão aumentando na taxa mais rápida já registrada, causando maior dissolução de CO_2 no oceano, levando a um processo conhecido como acidificação oceânica (AO) [1-2]. O aumento de CO_2 deriva de ações antrópicas como a queima de combustíveis fósseis, produção de cimento, agricultura e desmatamento [3], ou de forma natural através de erupções vulcânicas. Quando o CO_2 entra

em contato com a água do mar, ele passa por transformações químicas dando origem ao ácido carbônico (H_2CO_3), que rapidamente se dissocia produzindo íons bicarbonato (HCO_3^-) e H^+, o que consequentemente reduz os valores de pH do meio [4]. Atualmente, o pH médio da água do mar é de 8,1. Esse número já é 0,1 unidades de pH menor desde 1750 [1-2]. Outros estudos mostram que a contínua emissão de CO_2 pode implicar em uma redução de 0,3 e 0,6 unidades de pH até o final do século XXI [5-6-7]. Essa redução nos valores de pH pode causar efeitos nos organismos marinhos como estresse fisiológico individual, crescimento, reprodução, sobrevivência e taxa de calcificação reduzida, particularmente em corais e moluscos [8]. A calcificação dos organismos se dá através da absorção de CO_2 pelo oceano em quantidades normais, a reação química favorece a formação de carbonato de cálcio ($CaCO_3$), utilizado por diversos organismos marinhos na calcificação. Com o aumento intenso de CO_2 na atmosfera e consequente diminuição do pH nos oceanos acaba por alterar o sentido destas reações, fazendo com que o carbonato dos ambientes marinhos se liguem com os íons H^+, sendo assim, ficam menos disponíveis para a calcificação dos organismos, afetando o estágio de vida inicial dos mesmos [9].

Recentemente, estudos vêm identificando a ocorrência de drogas ilícitas nos ecossistemas aquáticos e apontando seu possível risco ambiental [10-11]. No ambiente marinho, Pereira et al. [12] encontraram em um estudo realizado na costa brasileira (Santos/SP) altas concentrações de cocaína e seus derivados (16,6 – 537 ng/L). Derivado da cocaína, o crack é preparado a partir da extração de uma substância alcaloide da planta *Erythroxylon coca* e da adição de sais ácidos (SO_4, NO_3, HCl), tornando-o um composto polar e hidrossolúvel. Quando misturado com o bicarbonato de sódio (Na_2CO_3) se transforma em base livre [13]. No ambiente marinho, tanto o composto em forma de pó quanto em sua forma sólida torna-se bases livres devido ao efeito do pH da água do mar na ionização das bases fracas [13]. Devido aos valores de pKa (constante de dissociação ácida) para cada composto, eles podem estar mais biodisponíveis no ambiente marinho. Em relação à droga ilícita cocaína, o seu valor de pKa é de 8,5, podendo ser encontrada na sua forma não-iônica em uma área de pH 7,9 a 8,1 como na Baía de Santos, onde seu coeficiente de partição aquosa (log Kow) de 0,10 na forma iônica aumenta para 2,30 na forma não-iônica. O aumento do valor de log Kow favorece os processos de absorção e bioacumulação nos organismos expostos, podendo aumentar a toxicidade do composto [12].

Objetivos: O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito subletal da droga ilícita crack combinada com a acidificação pelo enriquecimento de CO_2 nos ecossistemas marinhos

em organismos não-alvo, a partir da análise do biomarcador de efeito neurotóxico acetilcolinesterase (AChe).

Material e Métodos

O sistema de injeção de CO_2 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 elas são fechadas assim que o pH alvo é atingido. Indivíduos adultos do mexilhão *Perna perna* foram expostos em aquários com 20 litros de água, previamente coletada e filtrada, da Praia da Enseada, em Guarujá, SP / Brasil. Foi utilizado um controle de pH 8,1, valor encontrado na Baía de Santos. Os diferentes valores de pH utilizados (7,5; 7,0; 6,5 e 6,0) foram ajustados e controlados pelo sistema de injeção de CO_2. Para cada pH usado foram usadas diferentes concentrações de crack/cocaína (0,5; 5; 50 µg/L). Em cada aquário foram expostos 10 mexilhões em condições controladas durante 48 horas. Ao fim do experimento os mexilhões foram dissecados e suas brânquias congeladas a -80°C para determinar a atividade da Ache. Para a análise desse biomarcador, as brânquias de mexilhão foram homogeneizadas com uma solução tampão contendo Tris-HCl (50mM), EDTA (1mM), ditiotreitol (DTT; 1mM), sacarose (50mM), KCl (150mM) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF; 100mM). Após a homegeinização as amostras foram centrifugadas a 12.000 giros durante 20 min a 4°C e o sobrenadante separado para a análise que foi realizada a 415nm, utilizando o método colorimétrico de Classics Ellman et al. [14].

Resultados

Os resultados da análise do neurotransmissor AChe são apresentados na Figura 1.

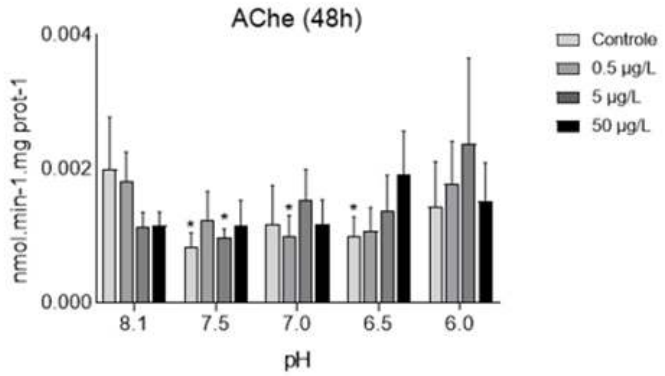


Figura 1. Média e desvio padrão dos resultados da enzima AChe avaliada em 48 horas em diferentes valores de pH e concentrações de crack. (*) reflete os valores que diferenciam significativamente do controle do pH 8,1.

Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa nos pH 7,5 no controle e na concentração 5,0 µg/l, pH 7,0 na concentração 0,5 µg/l e pH 6,5 no controle.

Discussão

A acetilcolinesterase está presente na classe de enzimas colinesterase (Che), sendo uma enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) [15-16], responsável por transmitir impulsos nervosos entre os neurónios [17]. Há xenobióticos capazes de inibirem a produção de AChe, fazendo com que haja contínua produção de ACh, com estímulo nervoso contínuo nas junções neuromusculares [18]. No presente estudo foi possível observar efeito neurotóxico de inibição de AChe mais acentuado em pH reduzidos, demostrando efeito combinado da droga ilícita e acidificação oceânica. Essa alteração na AChe em moluscos bivalves pode alterar o controle do fechamento das válvulas, alterações nos movimentos musculares, no batimento ciliar, em diferentes funções fisiológicas como fuga, locomoção, taxa de filtração e alimentação [19].

Conclusão

Conclui-se que a exposição de crack e a diminuição do pH causaram efeito sublethal (neurotoxicidade) no mexilhão *P. perna*, o que pode ser observado em futuros cenários de acidificação em regiões costeiras contaminadas por drogas ilícitas.

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

Referências

1. Raven J et al. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. The Royal Society, 2005.
2. Bernstein L, Bosch P, Canziani O, Chen Z, Christ R, Davidson O et al. Climate Change 2007. Geneva, Switzerland: IPCC, 2008. 104 p.
3. Millero F J; Huang F; Laferiere A L. Solubility of oxygen in the major sea salts as a function of concentration and temperature. Marine chemistry, v. 78, n. 4, p. 217-230, 2002.
4. Caldeira K; Wickett M. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. Journal of Geophysical Research: Oceans, v. 110, n. C9, 2005.
5. Joos F et al. Impact of climate change mitigation on ocean acidification projections. Ocean acidification, p. 272-290, 2011.
6. IPPC. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014. Summary for Policymakers, In: Edenhofer OR, Pichs-Madruga Y, Sokona E, Farahani S, Kadner K, Seyboth A, Adler I et al. (eds) Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change. Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY USA.

7. Gazeau F et al. Impact of elevated CO2 on shellfish calcification. Geophysical research letters, v. 34, n. 7, 2007.
8. Doney S et al. Ocean acidification: the other CO2 problem. Annual review of marine science, v. 1, p. 169-192, 2009.
9. Raimundo S; Da Silva G. Ecologia de costões rochosos e metodologias e amostragem. Laboratório de Ensino de Botânica, p. 66.
10. Binelli A et al. Illicit drugs as new environmental pollutants: cyto-genotoxic effects of cocaine on the biological model Dreissena polymorpha. Chemosphere, v. 86, n. 9, p. 906-911, 2012.
11. Binelli A et al. First evidence of protein profile alteration due to the main cocaine metabolite (benzoylecgonine) in a freshwater biological model. Aquatic toxicology, v. 140, p. 268-278, 2013.
12. Pereira C et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. Science of the Total Environment, v. 548, p. 148-154, 2016.
13. Florence A T, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. Pharm. Press, pp. 286 e 290, 2006.
14. Classics Ellman, G L et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, v. 7, p. 88-95, 1961.
15. Westfall T C, Westfall D P. Em Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica, eds.; Mc Graw Hill, cap. 6, 2006.
16. Colovic M B, Krstic D Z, Lazarevic-Pasti T D, Bondzic A M, Vasic V M Acetylcholinesterase Inhibitors:Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology, 11, 315., 2013. [CrossRef] [PubMed]
17. STENESH J. Plenum. In: Bioindicadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR), Biochemistry 1998.
18. Inouye K, Oliveira G H. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para Doença de Alzheimer. Infarma, 15, 80, 2004.
19. Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use ofbiomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp. Biochem. Physiol. C 146, 281–300, 2007.