

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

ALINE SATURNINO SOUTO KAMIMURA

ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DO CRACK EMPREGANDO COMO
MODELO MEXILHÕES MARINHOS *Perna perna* (BIVALVIA: MYTILIDAE)

SANTOS - SP

2018

ALINE SATURNINO SOUTO KAMIMURA

**ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DO CRACK EMPREGANDO COMO
MODELO MEXILHÕES MARINHOS *Perna perna* (BIVALVIA: MYTILIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e da Prof^a. Dr^a Luciane Alves Maranhão.

SANTOS - SP

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

574.5263 Kamimura, Aline Saturnino Souto.
6K23e Estudo Ecotoxicológico do *Crack* Empregando Como Modelo Mexilhões Marinhos *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae)/ Aline Saturnino Souto Kamimura - 2018.
f.:52p.

Orientador: prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Coorientador: prof^a. Dr^a. Luciane Alves Maranhão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, 2018.

1. *Crack*. 2. Ecossistema marinho.
3. Mexilhões 4. Efeitos reprodutivos.
5. Citotoxicidade. I. Pereira, Camilo Dias Seabra. II. Maranhão, Luciane Alves. III. Estudo Ecotoxicológico do *Crack* Empregando Como Modelo Mexilhões Marinhos *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae).

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta.

Dedico este trabalho a Deus por proporcionar todas as minhas conquistas, a todos os meus familiares pelo grande companheirismo nos momentos de aflição e por acreditarem sempre na minha capacidade de vencer os desafios aos quais precisei encarar, assim como pelo encorajamento diário.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me colocar no caminho que estou hoje com as pessoas que fazem parte dele e por me dar forças diárias até o alcance desta conquista (não foi fácil!).

Aos meus avós (Maria do Socorro e José – *em memória*), pelo incentivo constante durante suas passagens neste plano terrestre. Não houve incentivo maior do que o deles! Amo-os infinitamente.

Aos meus pais Nélcia Saturnino e Adailton Costa por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me incentivando a ser cada dia melhor. Obrigada por todos os bons exemplos e pelo amor que sempre me deram. Amo vocês.

Ao meu amado esposo Augusto Kamimura por aguentar todas as crises, pelo companheirismo e apoios incondicionais nos momentos mais cruciais desta jornada.

Ao meu querido irmão André Souto e minha cunhada Nadiely Santos por todo incentivo e por acreditarem e orgulharem-se sempre do meu empenho, obrigada de coração por tudo e principalmente, pelo presente de ser madrinha da nossa pequena Lívia, o motivo da minha alegria nas horas mais difíceis.

A minha querida amiga Marina Medeiro pelas risadas e momentos de relaxamento durante não só esse processo, mas durante a vida.

A minha amiga Bárbara Faria que tive a honra de conhecer nesta jornada, pelas trocas de conhecimentos e pelos desabafos ao longo do tempo.

A minha amiga e professora do ensino fundamental II, Roseli Baraçal, que pude reencontrar e conviver com muito amor e alegria.

Aos professores do mestrado pelos muitos ensinamentos durante o curso.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos integrantes do laboratório de ECOTOX que fazem daquele ambiente um lugar incrível de trabalhar. Obrigada pela ajuda e pelos ensinamentos.

Ao meu orientador professor Dr. Camilo Dias Seabra Pereira pela oportunidade de poder trabalhar com alguém tão competente. Obrigada pelos ensinamentos e pela paciência.

A minha querida orientadora professora Dr^a Luciane Alves Maranhão, que foi o meu refúgio e meu suporte nos momentos mais desesperadores nesta jornada tão trabalhosa, onde encarei situações de doenças, contratemplos e no entendimento do assunto. Obrigada por tudo! Eu sempre busquei lembrar de você quando pensava em desistir, pela sua calma, gentileza, disponibilidade, apoio e por não deixar eu me desesperar com todo seu encorajamento.

Aos meus professores da graduação que sempre estiveram ao meu lado transmitindo-me o conhecimento.

A Sandra e a Imaculada por toda gentileza, dedicação e carinho. Vocês são exemplos de pessoas para um mundo melhor.

A minha coordenadora Valdinês Martiliano e a minha diretora Lúcia França do colégio COC Novomundo por sempre me ajudarem nos momentos que precisei deixar a escola para fazer os testes e reuniões do mestrado. Muito obrigada de coração!

A minha coordenadora Melina Almeida por todo amor, carinho e incentivo no final desta jornada.

Obrigada a todos que fizeram parte dessa jornada.

“Se enxerguei mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

(Isaac Newton)

RESUMO

As concentrações de cocaína encontradas em ecossistemas costeiros são de preocupação ambiental por serem compostos bioativos, podendo bioacumular ou causar efeitos nocivos a organismos não-alvo como ao mexilhão marinho *Perna perna*. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do *crack* em diferentes fases da vida do mexilhão *Perna perna*, por meio de ensaios de fertilização, desenvolvimento embrionário e larval e estabilidade da membrana lisossomal de hemócitos em organismos adultos. Os resultados foram avaliados através do Trimmed Sperm-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. Para o desenvolvimento embrionário e larval foram observados $CE_{50\ 48h} = 16,31$ mg/L, CENO = 0,625 mg/L e CEO = 1,25 mg/L. Para a membrana lisossomal foram observados 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, a citotoxicidade foi observada em concentrações ambientalmente relevantes (µg/L), denotando risco à saúde de organismos não-alvo. Este estudo tem caráter inovador pelo ineditismo da avaliação ecotoxicológica de drogas ilícitas empregando organismos marinhos, com a detecção de efeitos deletérios do composto estudado, fator primordial para avaliação de riscos ambientais de substâncias bioativas.

Palavras-chave: *Crack*. Ecossistema Costeiro. Mexilhões. Efeitos Reprodutivos. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The cocaine concentrations quantified in coastal environments ecosystems are of environmental concern because they are bioactive compounds that can bioaccumulate or cause harmful effects to non-target organisms as the marine mussel *Perna perna*. The aim of this study was to evaluate the sublethal effects of *crack* in different life stages 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 Spearman-Kärber and ANOVA followed by Dunnett. The fertilization endpoints showed the Effect Concentration at 50% of the exposed gametes $EC_{50\ 1h} = 23.53$ mg/L, while the Non Observed Effect Concentration (NOEC) was 10 mg/L, and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) was 20 mg/L. Embryonic and larval development were observed at $EC_{50\ 48h} = 16.31$ mg/L, NOEC = 0.625 mg/L and LOEC = 1.25 mg/L. Effects to the lysosomal membrane stability were observed at NOEC = 0.5 μ g/L and LOEC = 5.0 μ g/L. This study demonstrated that *crack* caused effects on reproductive aspects on *P. perna* mussels at concentrations of cocaine above those detected in aquatic environments. However, cytotoxicity was observed in environmentally relevant concentrations (μ g/L), denoting health risk to non-target organisms. This study is innovative because of the novelty of the ecotoxicological evaluation of illicit drugs using marine organisms, with the detection of deleterious effects of the compound studied, a primary factor for the evaluation of environmental risks of bioactive substances.

Keywords: *Crack Cocaine*. Coastal Ecosystem. Mussels. Reproductive Effects. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química. A) Cocaína e B) Subproduto *Crack*..... 22
- Figura 2** - Ensaio de fertilização. A) Célula não fertilizada indicada pela seta; B) Célula fertilizada. A seta indica a presença do corpúsculo polar; C) e D) Células fertilizadas. A seta indica diferentes estágios de clivagem celular..... 26
- Figura 3** – Ensaio de desenvolvimento embriolarval. A) Indicado pela seta vermelha a larva Véliger do mexilhão *Perna perna* em desenvolvimento normal; B) e C) Indicado pelas setas verde, o desenvolvimento anormal da larva Véliger..... 27
- Figura 4** - Ensaio de citotoxicidade com o corante vermelho neutro. A) Células saudáveis e B) Células estressadas. (Fonte: Souza, 2016)..... 29
- Figura 5** - Ensaio 1 - Resultados de ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora em concentrações de 10; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 mg/L de *crack*. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$.
..... 32
- Figura 6** - Ensaio 2 - Resultados de ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora nas concentrações de 0,03; 0,3; 3 e 30 mg/L de *crack*. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$ 32
- Figura 7** - Ensaio 3 - Resultados de ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/L de *crack*. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$ 33
- Figura 8** - Ensaio 1 - Resultados de ensaio de desenvolvimento embriolarval. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 10; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 mg/L de *crack*. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$ 34

Figura 9 - Ensaio 2 - Resultados de ensaio de desenvolvimento embriolarval. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 0,03; 0,3; 3 e 30 mg/L de <i>crack</i> . Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$	34
Figura 10 - Ensaio 3 - Resultados de ensaio de desenvolvimento embriolarval. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/L de <i>crack</i> . Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$	35
Figura 11 - Estabilidade da membrana lisossômica (LMS) avaliada através do teste de tempo de retenção de corante Vermelho Neutro (TRCVN) em hemócitos de mexilhão <i>P. perna</i> . Os indivíduos foram expostos por 48 horas em concentrações de <i>crack</i> de 0,5; 5; 50 e 500 µg/L. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$	36
Figura 12 - Página do artigo referente a este estudo, publicado no periódico <i>Marine Pollution Bulletin</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do <i>crack</i>	22
Tabela 2 - Parâmetros de MRM.....	24
Tabela 3 - Concentrações de <i>crack</i> utilizadas nos ensaios de fertilização e desenvolvimento embriolarval	24
Tabela 4 - Critérios de análise de células saudáveis e estressadas em hemócitos de mexilhões <i>Perna perna</i>	29
Tabela 5 - Concentrações nominal e real de cocaína utilizada na exposição dos organismos adultos ($\mu\text{g/L}$).....	31
Tabela 6 - Análise de toxicidade dos ensaios de fertilização e desenvolvimento embriolarval realizados em mexilhões <i>Perna perna</i> expostos as concentrações de <i>crack</i> (mg/L), expressos em CE_{50} , CENO e CEO	35
Tabela 7 - Citotoxicidade de <i>crack</i> em hemócitos de mexilhões <i>Perna perna</i> . Expressos valores de CE_{50} , CENO e CEO em $\mu\text{g/L}$	36

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC - Sistema Nervoso Central

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

TRCVN - Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

MRM - Modo de Monitorização de Reação Múltipla

IPEN/USP - Instituto de Pesquisas Nucleares da Universidade de São Paulo

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massas

EFS - Extração em Fase Sólida

DMSO - Solvente Orgânico Dimetilsulfóxido

VN - Vermelho Neutro

pH - Potencial hidrogeniônico

CE₅₀ - Concentração de efeito a 50% dos organismos

CEO - Concentração de efeito observado

CENO - Concentração de efeito não observado

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EML - Estabilidade da Membrana Lisossômica

EMEA -European Medicines Agency (Agência Europeia de Medicamentos)

PNEC - Concentração Previsivelmente Sem Efeito (Predicted No Effect Concentration)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1. Objetivos Específicosl	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Organismos de teste – Mexilhões <i>Perna perna</i>	21
3.2. <i>Crack</i> (subproduto da cocaína) – Substância teste	22
3.3. Obtenção do <i>Crack</i>	23
3.3.1 Extração em fase sólida (EFS).....	23
3.3.2 Análise LC-MS/MS	23
3.4. Ensaios ecotoxicológicos	24
3.4.1. Soluções teste	24
3.4.2. Água para diluição.....	25
3.5. Ensaio de fertilização	25
3.6. Ensaio de desenvolvimento embrionário e larval	27
3.7. Ensaio de tempo de retenção do corante vermelho neutro	28
3.8. Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Concentração de cocaína nas alíquotas de <i>crack</i>	31
4.2. Efeitos do <i>crack</i> nos ensaios de fertilização e desenvolvimento embriolarval.....	31
4.3. Ensaio de efeito citotóxico de <i>crack</i> (hemócitos).....	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	52

1. INTRODUÇÃO

Com a população mundial crescendo e se concentrando nas áreas costeiras, os ecossistemas marinhos se encontram constantemente expostos às águas residuais tratadas e não tratadas, compostas de uma mistura de contaminantes emergentes que incluem compostos bioativos.

O consumo de fármacos é geralmente associado com a promoção da longevidade e vidas estressantes, particularmente nas áreas urbanas. Os avanços na medicina, o significativo aumento das indústrias químicas e farmacêuticas, e mudanças nas condições sociais têm levado aos mais diversos usos de substâncias farmacêuticas e psicotrópicas (BOROVA et al., 2014).

As drogas ilícitas são um crescente problema de saúde pública em todo o mundo. As mais consumidas são a cocaína e a maconha. O World Drug Report (UNODC, 2014) observou que o maior consumo de cocaína (incluindo o subproduto de cocaína, o *crack*) ocorre nas Américas. O uso ilícito de drogas aumentou drasticamente nas últimas décadas em países da América do Sul (JOHNSON et al., 2013).

Os usuários brasileiros de cocaína e seus subprodutos foram estimados em quase dois milhões no período 2004 - 2005, e este número subiu para 3,35 milhões em 2012 (UNODC, 2014). Esses dados mostram que o consumo desta droga ilícita no Brasil cresce constantemente e pode ser considerado como "epidemia", principalmente nas regiões metropolitanas (OLIVEIRA et al., 2014). O consumo e o tráfico de cocaína na América do Sul tornaram-se proeminentes, particularmente no Brasil, devido a fatores como a localização geográfica e o aumento da população agrupada em centros urbanos. Atualmente, o Brasil é o maior mercado mundial de cocaína e *crack* (LARANJEIRA et al., 2012).

O aumento do consumo de drogas ilícitas produz não apenas problemas de saúde pública, mas também induz potenciais impactos ambientais, uma vez que estes contaminantes de preocupação emergente foram recentemente identificados como tóxicos para organismos aquáticos (BINELLI et al., 2012, 2013, PAROLINI et al., 2013).

A presença de drogas ilícitas no meio ambiente se deve principalmente à liberação de águas residuais *in natura* e 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 ambientais de cocaína nas águas superficiais (BAKER et al., 2012, BAKER & KASPRZYK-HORDERN, 2013, CASTIGLIONI et al., 2011, HERNANDEZ et al., 2015, METCALFE et al., 2010, VAN NUIJS et al., 2009). Contudo, existem poucos estudos que avaliaram ambientes estuarinos e marinhos (PEREIRA et al., 2016). Klosterhaus et al. (2013) encontraram 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. (2016) 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).

A ocorrência de cocaína e seu principal metabólito benzoilecgonina nas águas costeiras sugere a necessidade de estudos ecotoxicológicos para elucidar o mecanismo de ação e os efeitos adversos desses compostos na biota marinha. Na literatura, há escassez de dados disponíveis sobre possíveis danos produzidos por drogas ilícitas ou subprodutos em organismos marinhos. Quando organismos não-alvo (denominação dada àqueles que sofrem interferência de substâncias emergentes de maneira não intencional) são expostos a essas substâncias, torna-se necessário avaliar os efeitos tóxicos sobre a biota. Para tanto, ensaios ecotoxicológicos são amplamente utilizados com vertebrados e invertebrados aquáticos. Os estudos ecotoxicológicos podem ser aplicados desde os níveis mais básicos de organização biológica, como moleculares e bioquímicos, até os níveis mais complexos, como as comunidades e os ecossistemas, a fim de esclarecer os riscos tóxicos ocasionados pela inserção de compostos tóxicos lançados ao ambiente (MAZUR, 2015). As legislações federais, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 357/2005 e sua complementação CONAMA 430/2011, propõem o uso de ensaios ecotoxicológicos, como testes agudos e crônicos, para avaliar a extensão da toxicidade de compostos xenobióticos.

Em ensaios de efeito agudo ou de fertilização é possível observar resultados em um curto período de tempo de exposição, sendo avaliados efeitos nocivos ou mortalidade dos organismos. No ensaio de fertilização mede-se a capacidade de células espermáticas, após a exposição de um xenobiótico, para promover a fertilização (USEPA, 1991; ZARONI et al., 2005). Já nos ensaios crônicos ou de desenvolvimento embrionário, são observados os efeitos tóxicos no ciclo de vida dos organismos, verificando-se o desenvolvimento precoce da vida de zigotos expostos a determinadas substâncias xenobióticas (ASTM, 1992; ZARONI et al., 2005). Como resposta aos efeitos crônicos é notório verificar alterações morfológicas e a diminuição da taxa reprodutiva (ASTM, 1992; ZARONI et al., 2005).

De acordo com Cesar et. al. (1997) os ensaios ecotoxicológicos de fertilização e de desenvolvimento embrionário são de extrema importância no processo de monitoramento ambiental, uma vez que podem auxiliar na compreensão dos efeitos causados ao ambiente aquático exposto a diversos xenobióticos, a fim de identificar possíveis impactos e, conseqüentemente, controlar os efeitos biológicos ocasionados por consequência da exposição a compostos químicos. Além disso, importa também verificar os primeiros sinais de efeitos de um contaminante emergente e contribuir na prevenção de danos, para isto, utiliza-se os biomarcadores que se definem como: alterações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou variações comportamentais, sendo possível a avaliação destes em amostras de tecidos ou fluídos corpóreos (NASCIMENTO et al., 2008; PEREIRA et al., 2014).

Nos lisossomos, que são as organelas responsáveis pela remoção de compostos tóxicos do citosol, existe uma membrana semipermeável que o envolve e nela contém enzimas hidrolíticas que realizam inúmeros processos celulares, tais como digestão, defesa e imunorreação (PIPE, 1993; FERREIRA et al., 2003; STEFANONI et al., 2008). Os lisossomos são responsáveis por reterem muitas substâncias tóxicas e isso pode causar perturbações e danos à membrana lisossomal (FREIRE et al., 2008). Estes danos podem ser medidos utilizando o tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos compartimentos lisossômicos das células (LOWE et al., 1994). Nesse sentido, um dos métodos mais utilizados, por ser relativamente simples e eficaz, para identificar danos na membrana lisossomal, tem sido o ensaio do tempo de

retenção do corante Vermelho Neutro (TRCVN), com o objetivo de monitoramento ambiental ao detectar danos iniciais em organismos e ao ambiente (LOWE et al., 1995).

Nos estudos de Martinez-Gómez et al. (2008), utilizou-se o biomarcador celular de estabilidade lisossômica TRCVN a fim de avaliar a saúde de mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis* provenientes da costa do Mar do Mediterrâneo. O TRCVN foi proposto como indicador de índice de poluição ambiental para inclusão nos vários programas nacionais de monitoramento para o Mar Mediterrâneo (MED POL – Mediterranean Sea Program) de acordo com a convenção de Barcelona (MARTINEZ-GÓMEZ et al., 2008).

O TRCVN avalia a estabilidade da membrana lisossômica que vem sendo utilizada como um indicador de “bem estar” celular. Danos na membrana lisossômica causados pelo impacto de xenobióticos pode diminuir os tempos TRCVN induzindo o extravazamento de componentes da membrana lisossômica para o citosol (DAILIANIS et al., 2003). Em consequência aos danos da membrana lisossômica, é possível avaliar processos como autofagia e degeneração celular (PEREIRA, 2008).

Segundo Binelli et al. (2012), há poucos dados disponíveis sobre os efeitos agudos ou crônicos desses compostos na comunidade aquática. Já efeitos citogenotóxicos foram detectados, em análises realizadas com mexilhão zebra (*Dreissena polymorpha*) expostos às concentrações ambientais de cocaína (BINELLI et al., 2012), benzoilecgonina (PAROLINI et al., 2013) e de uma mistura de cocaína, benzoilecgonina, anfetamina, morfina e 3, 4 – metilenodioximetanfetamina (ecstasy) (PAROLINI et al., 2015).

Para realização de estudos ecotoxicológicos devem ser escolhidos organismos sensíveis e representativos para o estudo em questão, bem como padronizados de acordo com as legislações federais e conforme a literatura, a fim de garantir confiabilidade nos resultados (ZAGATTO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2002). Nesse cenário, o mexilhão *Perna perna* é muito utilizado por ser sésil, encontrado com frequência nas regiões litorâneas, com grande importância na cadeia alimentar costeira, além de importância econômica por ser cultivado ou extraído de costões rochosos, trazendo sustento às comunidades ribeirinhas (PEREIRA, 2008). Para tanto, a sua alimentação constitui-se de partículas que são filtradas, contudo, compostos

químicos também podem ser filtrados e acumularem em seus tecidos. Sendo assim, um excelente bioindicador previamente validado como organismo-teste recomendado para avaliações de qualidade ambiental (ABESSA et al., 2005; PEREIRA et al., 2007, 2011, 2012, CORTEZ et al., 2012).

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade da droga ilícita *crack* para organismos marinhos empregando como modelo o mexilhão *Perna perna*.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade do *crack* em gametas de mexilhões *Perna perna* na fase de fertilização.
- Analisar a toxicidade do *crack* em embriões de mexilhões *Perna perna* na fase de desenvolvimento embriolarval.
- Verificar a citotoxicidade do *crack* em hemócitos de mexilhões *Perna perna*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismos - teste – Mexilhões *Perna perna*

Os mexilhões pertencem ao Filo Mollusca e a Classe Bivalvia. Possuem hábito de vida planctônica na fase larval e sésil na vida adulta. A alimentação é por meio de filtração de partículas, o que torna a brânquia bem adaptada ao hábito alimentar dessa classe. Os organismos são dioicos (indivíduos com sexos separados: macho e fêmea) com reprodução por meio da liberação de gametas na coluna d'água, desenvolvimento em estádios de fases larvais e posterior fixação em substratos como os costões rochosos (Hickmann *et al.*, 2004).

Os mexilhões da espécie *Perna perna* são encontrados em abundância nas regiões litorâneas do Brasil na zona entre marés e infralitoral, fixos a rochas, formando densos bancos naturais. Morfologicamente esses organismos apresentam corpo mole protegido por duas conchas iguais (valvas) unidas pelo músculo adutor.

Entre os organismos marinhos, os bivalves ganharam importância global como bioindicadores e foram amplamente utilizados em programas de biomonitoramento de águas costeiras (AGUIRRE-MARTÍNEZ *et al.*, 2013; MARANHO *et al.*, 2015a; MARTÍN-DIAZ *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014). Estes organismos têm uma ampla distribuição geográfica, disponibilidade no campo e por meio da produção de aquicultura, bem como a adequação para laboratório e ensaios *in situ* (CAJARAVILLE *et al.*, 2000, MARANHO *et al.*, 2015b).

Para este estudo, foram utilizados mexilhões adultos *Perna perna*, coletados em uma região de cultivo localizada na praia da Cocanha, no município de Caraguatatuba, São Paulo. Após coletados, os organismos foram colocados em caixas térmicas e transportados ao laboratório de Ecotoxicologia Professor Caetano Belliboni, da Universidade Santa Cecília em Santos, SP. No laboratório, os organismos foram aclimatados em tanque de 3.500 L de água do mar com salinidade 32 ± 2 ppm, temperatura de 25°C e aeração constante, permanecendo por 48 horas antes da realização dos experimentos.

3.2 Crack (subproduto da cocaína) – Substância teste

A cocaína é uma droga estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) e um potente anestésico local, cujos efeitos apresentam curta duração e dependem do modo de consumo, ocasionando posterior estado de depressão. É extraída das folhas do vegetal *Erytroxylum coca*. A cocaína pode ser consumida como sal, cloridrato de cocaína, ou na forma de base, o *crack*. O cloridrato de cocaína é um sal solúvel em água e obtido na forma de pó. Sua administração pode ser por aspiração ou via intravenosa (CONCEIÇÃO et al., 2014). Já o *crack* é um subproduto da cocaína extremamente tóxico, sua forma básica é obtida pelo aquecimento da solução aquosa de cloridrato de cocaína com um composto básico, geralmente o bicarbonato ou hidróxido de sódio. Esse procedimento envolve o aquecimento até a obtenção de uma solução oleosa, seguido do resfriamento até a precipitação da base livre, com a formação de “pedras” que vaporizam a 98°C e podem ser fumadas. Apresenta-se pouco solúvel em água, mas é facilmente volatilizado quando aquecido (FALCK et al., 2008).

A estrutura química está representada na FIG. 1 e as propriedades físico químicas estão apresentadas na TAB. 1.

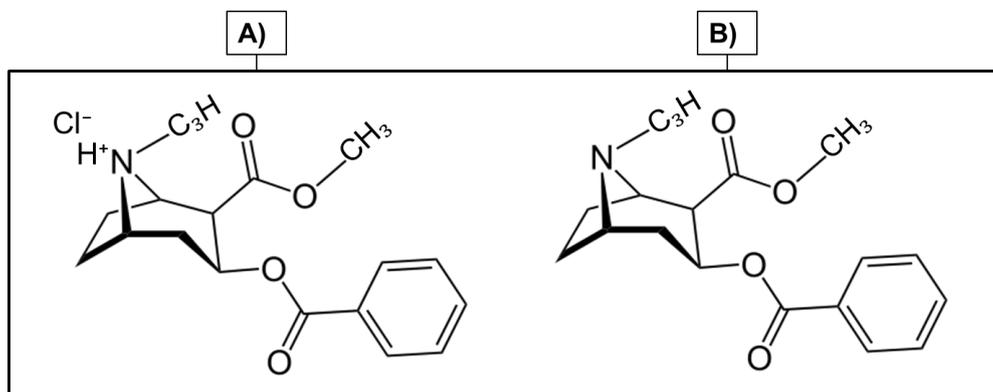


Figura 1 - Estrutura química. A) Cocaína e B) Subproduto Crack.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de crack.

Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Peso molecular	303,353 g/mol
Ponto de Fusão	98 °C
Ponto de Ebulição	187 °C
Meia vida biológica	60 minutos

3.3 Obtenção do Crack

As alíquotas de *crack* foram obtidas a partir da colaboração com o Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Campus Baixada Santista) e cedido 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 nº 1122/2013.

A análise quantitativa de concentração real de cocaína no lote de crack utilizado, assim como as concentrações de cocaína inicial (T0) nas soluções-teste dos ensaios ecotoxicológicos foram analisadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada do Instituto de Pesquisas Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN/USP), em Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massa (LC-MS/MS) híbrida, tipo quadrupolo linear íon trap (LC-QqLIT), no modo ESI (positivo e negativo) e Modo de Monitorização de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar a concentração de cocaína. Os resultados foram expressos em porcentagem de cocaína.

3.3.1. Extração em fase sólida (EFS)

Amostras retiradas dos aquários em T0 foram submetidas à extração por fase sólida (EFS) de acordo o procedimento adaptado de Wille et al. (2010) e Ghoshdastidar et al. (2015). Foram utilizados cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) para extração e obtenção dos eluatos.

3.3.2. Análise LC-MS/MS

A concentração de cocaína foi analisada por Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectômetro de Massas (LC-MS/MS) híbrida, tipo quadrupolo linear íon trap (LC-QqLIT), no modo ESI (positivo e negativo) e Modo de Monitorização de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e um produto de íons para quantificar e qualificar a cocaína (TAB. 2).

Tabela 2 - Parâmetros de MRM.

Composto	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (Min.)
Cocaína	304,2	182,2	36	27	4	3,0	12	3,90
		105,1	36	39	4			

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de degradação); CE (Energia de Colisão); CXP (Potencial de saída da colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção); MIM (monitoramento de íons múltiplos). Q3, célula superior, íon quantificador e na célula inferior, íon qualificador.

3.4. Ensaios ecotoxicológicos

Os efeitos de *crack* em diferentes fases da vida de *Perna perna* foram avaliados por meio dos seguintes ensaios: (i) o ensaio de fertilização (USEPA, 1991, com modificações de ZARONI et al., 2005), que mede a capacidade de células espermáticas, após a exposição ao *crack*, para promover a fertilização; (ii) o ensaio de desenvolvimento embrionário e larval (ASTM, 1992 com modificações de ZARONI et al., 2005), que avalia o desenvolvimento precoce da vida de zigotos expostos ao *crack*; e (iii) ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro (TRCVN) (LOWE et al., 1995), que avalia a estabilidade da membrana lisossômica em hemócitos como um biomarcador de efeito em adultos após a exposição ao *crack*.

3.4.1 Soluções teste

A fim de avaliar a toxicidade do *crack*, estipularam-se três ensaios com intervalos diferentes de concentrações para os testes de fertilização e desenvolvimento embriolarval com o objetivo de selecionar a concentração de efeito aos organismos mexilhões *Perna perna* (TAB. 3).

Tabela 3 - Concentrações de *crack* utilizadas nos ensaios de fertilização e desenvolvimento embriolarval.

Ensaio	Concentrações de <i>crack</i> (mg/L)
1º	10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100
2º	0,03; 0,3; 3 e 30
3º	0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20

Para o ensaio de citotoxicidade testou-se as concentrações de 0,5; 5; 50 e 500 µg/L de *crack*, incluindo a ambiental quantificada (0,537 µg/L) por Pereira et al. (2016).

Pelo fato da baixa solubilidade de *crack* em água, o composto foi diluído no solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO), para posteriormente ser diluído em água do mar para o preparo das soluções. Foram realizados dois testes controles sendo um somente com água do mar e outro com água do mar e o solvente DMSO (1:500 v/v). Para os testes, utilizou-se quatro réplicas (n = 4) tanto para os controles, quanto para as concentrações analisadas, com o objetivo de obter a média dos resultados, assim como para garantir a confiabilidade dos ensaios.

3.4.2 Água para diluição

A água para diluição foi cedida pelo Aquário do Guarujá (Guarujá, São Paulo). Seguindo American Society of Testing and Materials - ASTM (1992), com pequenas adaptações propostas por Zaroni et al. (2005), a água do mar foi previamente filtrada através de uma membrana de celulose de 0,22 µm para os ensaios agudos e crônicos. Para o TRCVN (LOWE et al., 1995), a água do mar foi filtrada (150 µm) e mantida sob constante aeração durante os ensaios. Os parâmetros físico-químicos da água de diluição e tratamentos foram medidos no início e no final dos ensaios. A temperatura foi mantida entre 22°C - 25°C, o pH entre 7,80-8,03, a salinidade entre 34-36 ppt, e oxigênio dissolvido entre 5,5-8,0 mg/L.

3.5. Ensaio de fertilização

Para avaliar a taxa de fertilização seguiu-se o protocolo recomendado para mexilhões pela USEPA (1991), com pequenas adaptações propostas por Zaroni et al. (2005).

Para a taxa de fertilização, os mexilhões *Perna perna* adultos (n = 5) foram induzidos a liberar gametas por estimulação térmica. Para isto, estes organismos foram colocados em uma bandeja e expostos a água de diluição a 4°C durante 30 min. Posteriormente, os indivíduos foram transferidos para outra bandeja com água de diluição a 25°C durante o mesmo período. As

bandejas foram agitadas, e a água mantida à 25°C, até a liberação dos gametas. Os gametas de pelo menos três machos e três fêmeas foram coletados separadamente e transferidos para béqueres de vidro e, conseqüentemente, analisou-se a viabilidade desses gametas utilizando-se um microscópio óptico e uma câmera de Sedgwick-Rafter, a fim de garantir a qualidade dos gametas utilizados.

Os espermatozoides foram expostos a diferentes concentrações de *crack* durante 60 minutos. Depois deste período, foram adicionados 100 µl de solução de espermatozoides a 60 µl de solução de óvulos aos tubos de ensaio contendo as diferentes concentrações de *crack*. Quarenta minutos depois de adicionar os óvulos, o teste foi finalizado com adição de 0,5 mL de formaldeído em cada réplica.

Com auxílio de uma câmera de Sedgwick-Rafter sob um microscópio óptico, óvulos fertilizados foram identificados e quantificados por meio da observação da presença do corpúsculo polar ou início de clivagens (FIG. 2). Utilizou-se quatro réplicas para cada grupo de concentração, incluindo o controle solvente (água do mar mais DMSO 1: 500 v/v) para obter valores médios de concentração de *crack* que causam a inibição de fertilização a 50% das células expostas (CE₅₀; 1 h). Os ensaios foram validados com 80% ou mais em ovos fertilizados nos controles.

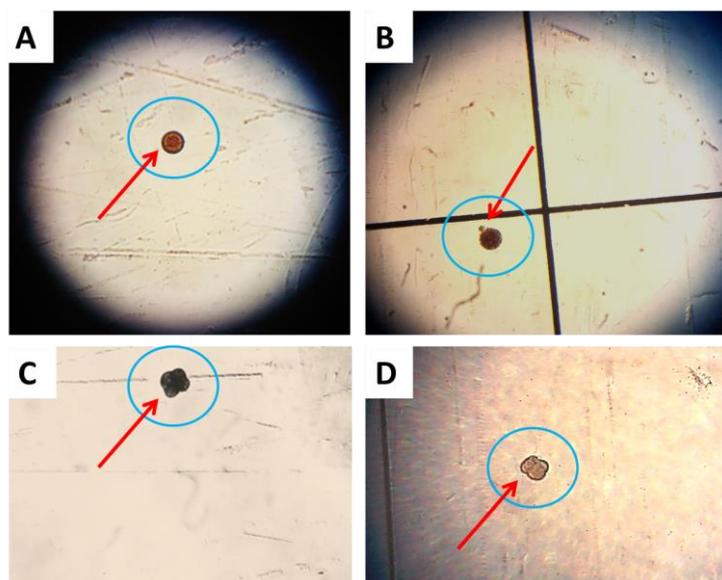


Figura 2 - Ensaio de fertilização. A) Célula não fertilizada indicada pela seta; B) Célula fertilizada. A seta indica a presença do corpúsculo polar; C) e D) Células fertilizadas. A seta indica diferentes estágios de clivagem célula

3.6. Ensaio de desenvolvimento embriolarval

A fim de avaliar a viabilidade do zigoto em desenvolver-se como larvas normais quando expostos ao *crack*, realizou-se os ensaios de acordo com o protocolo recomendado pela ASTM (1992) para mexilhões, com pequenas adaptações propostas por Zaroni et al. (2005). A reprodução dos indivíduos adultos de mexilhão *Perna perna* foi induzida por estimulação térmica. Os gametas dos machos e das fêmeas foram recolhidos, separados e transferidos para béqueres de vidro. A fertilização foi realizada com a adição de 2 mL de solução de espermatozoides e 200 mL de solução de óvulos. Assim como realizado no teste de fertilização, os gametas foram analisados quanto a sua viabilidade utilizando-se um microscópio óptico e uma câmera de Sedgwick-Rafter.

Com o auxílio do microscópio óptico e uma câmara de Sedgwick-Rafter, foi analisada a quantidade estimada de ovos fertilizados, e cerca de 500 embriões foram transferidos para tubos de ensaio contendo as diferentes concentrações de *crack*, durante um período de 48h a uma temperatura de 25°C e a salinidade de 35 ppt. Foram feitas quatro repetições para cada grupo, incluindo o controle solvente (água do mar mais DMSO 1: 500 v/v). Depois do período de exposição, o ensaio foi finalizado e as primeiras 100 larvas de cada repetição foram analisadas. As larvas desenvolvidas para fase Véliger ou “D” foram consideradas normais, enquanto aqueles apresentando atraso e/ou anomalias morfológicas em seu desenvolvimento foram consideradas anormais (FIG. 3).



Figura 3 - Ensaio de desenvolvimento embriolarval. A) Indicado pela seta vermelha a larva Véliger do mexilhão *Perna perna* em desenvolvimento normal; B) e C) Indicado pelas setas verde, o desenvolvimento anormal da larva Véliger.

3.7. Ensaio de tempo de retenção do corante vermelho neutro (TRCVN)

O ensaio foi conduzido de acordo com o protocolo de Lowe et al. (1995), e o objetivo foi verificar o Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN) pela membrana lisossomal.

Os espécimes de mexilhões adultos ($n = 10$ para cada concentração) foram colocados em aquários de 30 L com as diferentes concentrações de *crack* (0,5; 5; 50 e 500 $\mu\text{g/L}$), com base em concentrações de cocaína no ambiente, anteriormente relatado por Pereira et al., (2016) na Baía de Santos (São Paulo, Brasil). O controle foi feito com água do mar mais o solvente DMSO (1: 500 v/v). As soluções de teste foram alteradas diariamente em todos os tanques. Após um período de 48 horas de exposição, os mexilhões foram removidos do aquário para a extração da hemolinfa.

Empregou-se o método não destrutivo para retirada da hemolinfa do músculo adutor posterior dos mexilhões. A hemolinfa foi adicionada a uma solução salina fisiológica (pH 7,3 - Contendo HEPES 4,77 g/L, NaCl 25,48 g/L, MgSO_4 13,06 g/L, KCl 0,75 g/L, CaCl_2 1,47 g/L). Em seguida, 40 μL dessa solução foi depositada em uma lâmina previamente tratada com 10 μL de poly-L-lisina, sendo armazenada numa câmara úmida e escura durante 15 minutos a fim de promover uma melhor adesão das células à lâmina. Após esse tempo, o excesso de hemolinfa foi cuidadosamente retirado para melhorar a visualização.

A solução estoque de vermelho neutro foi preparada durante o período de incubação das células na lâmina tratada com poly-L-lisina. Uma massa de 28,8 mg do corante de vermelho neutro foi armazenada num pequeno frasco âmbar, onde foi adicionado 1 mL de DMSO para dissolver o composto. A solução de trabalho foi preparada com 10 μL dessa solução estoque, diluídos em 5 mL da solução fisiológica e foi mantida sob abrigo da luz.

Dentro da câmara escura, cada lâmina recebeu 40 μL do corante vermelho neutro (VN) que foi adicionado à monocamada de células. Uma tampa de deslizamento foi adicionada. Após um período de incubação de 15 minutos, as lâminas foram examinadas a cada 15 minutos por microscopia óptica (400x) para analisar anormalidades estruturais e perda de corante VN do

interior dos lisossomos para citosol (FIG.4). O ensaio foi finalizado quando foi verificada a perda evidente de corante em 50% (avaliado numericamente por campo de visão) dos hemócitos granulares e o tempo registrado. O valor médio do TRCVN foi calculado para cada concentração de *crack*. Os critérios de análise das células durante o ensaio estão descritos na TAB. 4.

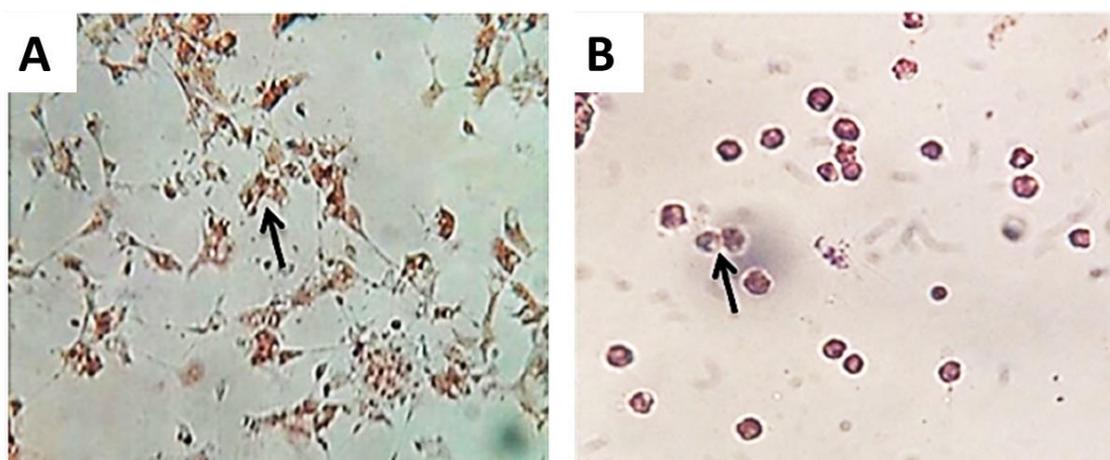


Figura 4 - Ensaio de citotoxicidade com o corante vermelho neutro. A) Células saudáveis e B) Células estressadas.
(Fonte: Souza, 2016).

Tabela 4 - Critérios de análise de células saudáveis e estressadas em hemócitos de mexilhões *Perna perna*.

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
Forma das células	Irregular	Arredondadas
Tamanho das células	Largas	Menores
Número de lisossomos	Muitos	Poucos
Tamanho dos lisossomos	Pequenos	Alargados / aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido ou rosado	Vermelhos ou rosa escuro
Pseudópodes	Visíveis	Não visíveis
Corante vazado das células	Não visíveis	Visíveis

Fonte: (KING, 2000).

3.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados em primeiro lugar para a normalidade usando o teste Qui-quadrado que analisou a normalidade dos dados através do agrupamento dos valores. A normalidade tem por objetivo avaliar se os valores oscilam simetricamente comparados à média.

O teste de Bartlett foi aplicado para grupos com diferentes ou mesmo número de réplicas para testar a homocedasticidade. Quando os dados são homogêneos ocorre o mesmo grau de dispersão em torno do valor central. O teste t de Student foi empregado para identificar diferenças significativas entre o controle e a maior concentração do solvente DMSO em cada ensaio. Uma vez atendidas as premissas de normalidade e homocedasticidade, ANOVA seguida pelo teste de Dunnett foi utilizada para identificar a maior concentração onde não foram detectados efeitos biológicos (CENO – Concentração de Efeito Não Observado) e as menores concentrações que causaram efeito (CEO) em cada ensaio. Nos ensaios de fertilização, desenvolvimento embriolarval e TRCVN foram estabelecidas as concentrações que causaram efeito a 50% das células avaliadas (CE_{50}) através do método de Trimmed Spearman-Kärber. O nível de significância foi analisado em $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada empregando o programa estático Graph Pad Prism 5.01.

4. RESULTADOS

4.1 Concentração de cocaína nas alíquotas de *crack*

As alíquotas de *crack* empregadas até o momento apresentaram 37,99% de cocaína. As concentrações de cocaína inicial (T0) foram analisadas para as soluções-teste do ensaio de TRCVN (TAB. 5).

Tabela 5 - Concentrações nominal e real de cocaína utilizada na exposição dos organismos adultos ($\mu\text{g/L}$).

Concentração nominal de <i>crack</i> cocaína	Concentração real de cocaína
0,5	0,202
5	2,02
50	20,2
500	202,0

4.2 Efeitos do *crack* nos ensaios de fertilização e desenvolvimento embriolarval

No ensaio 1, na fase de fertilização foi possível observar diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas a partir de 20 mg/L (FIG. 5). A partir desse ensaio foi possível determinar um intervalo entre as concentrações testadas que permitisse uma melhor determinação da CE_{50} . No ensaio 2, foi possível observar diferença significativa na taxa de fertilização a partir da concentração de 0,03 mg/L à 30 mg/L (FIG. 6). Já no ensaio 3, houve diferença significativa a partir das concentrações de 2,5 – 20 mg/L (FIG. 7).

Após a obtenção dos resultados do ensaio de fertilização, o ensaio 1 foi selecionado, pois apresentaram concentrações de efeito agudo aos mexilhões *Perna perna*, pela confiabilidade dos valores após os cálculos. Quanto ao ensaio 2, por não haver concentrações suficientes para cálculos confiáveis, não foi utilizado para se calcular as concentrações de efeito. Já o ensaio 3, não foi possível calcular a concentração de efeito à 50% dos organismos.

Portanto, a partir das concentrações do ensaio 1, foi possível verificar que o efeito do *crack* em gametas (ensaio de fertilização) ocorreu após 1 h de

exposição ($CE_{50} = 23,53 \text{ mg/L} \pm 0,79$). A concentração mais elevada testada, à qual não mostrou efeito observado (CENO) foi de 10 mg/L, enquanto que a menor concentração de efeito observado (CEO) foi de 20 mg/L. (TAB. 6).

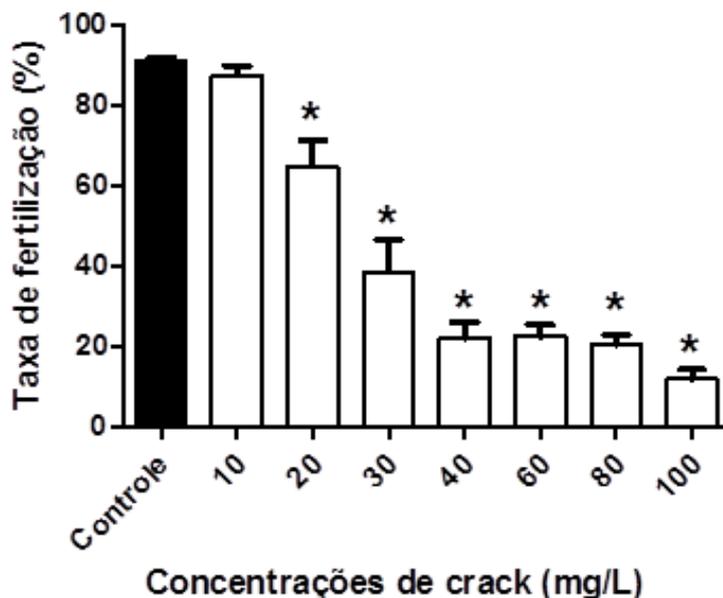


Figura 5 - Ensaio 1 - Resultados do ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora em concentrações de 10; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$.

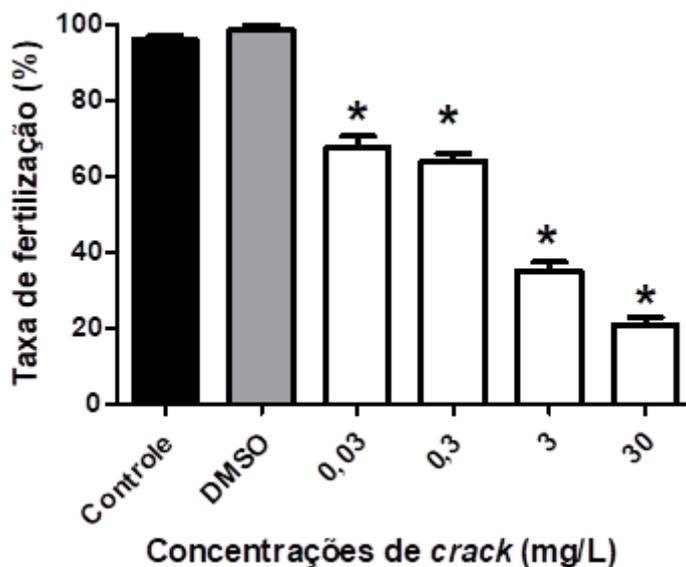


Figura 6 - Ensaio 2 - Resultados do ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora em concentrações de 0,03; 0,3; 3 e 30 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$.

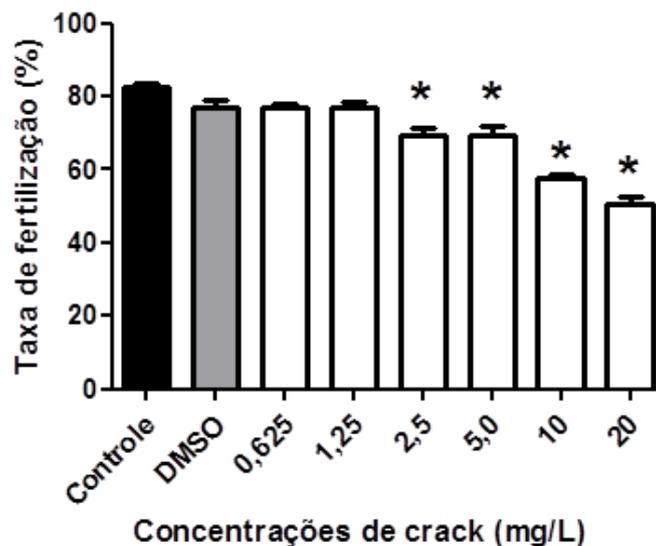


Figura 7 - Ensaio 3 - Resultados do ensaio de fertilização. Os gametas foram expostos durante 1 hora em concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas em $p < 0,05$.

Os resultados da toxicidade de crack, referentes ao desenvolvimento embriolarval do mexilhão *Perna perna* podem ser observados, respectivamente, nas figuras 8, 9 e 10. Os valores de CENO, CEO e CE₅₀ dos ensaios constam na tabela 6.

A partir do ensaio 1 foi possível determinar uma faixa mais estreita de concentrações para identificar CE₅₀ com mais precisão nos ensaios posteriores. No ensaio 1 (FIG. 8) foi observada uma diferença significativa em comparação ao controle, a partir da concentração de 10 mg/L, porém com inibição total do desenvolvimento embriolarval a partir da concentração de 20 - 100 mg/L respectivamente. No ensaio 2 (FIG. 9) é possível observar diferença significativa no desenvolvimento embriolarval a partir de 0,3 - 30 mg/L. Já no ensaio 3 (FIG. 10) a partir de 1,25 mg/L à 20 mg/L. Todas as concentrações que apresentaram diferenças significativas do controle tiveram seu desenvolvimento embriolarval negativamente influenciada, apresentando conchas vazias, larvas com extrusão de material, concha deformada ou massa amorfa.

Os efeitos tóxicos em 50% dos organismos (CE₅₀) no desenvolvimento embrionário e larval ocorreu em um período de 48h de exposição em concentrações de crack no valor de 16,31 mg/L \pm 0,48. A concentração mais

elevada testada que não mostrou efeito de toxicidade (CENO) foi de 0,625 mg/L, enquanto que a menor concentração de efeito observado (CEO) foi de 1,25 mg/L. (TAB.6).

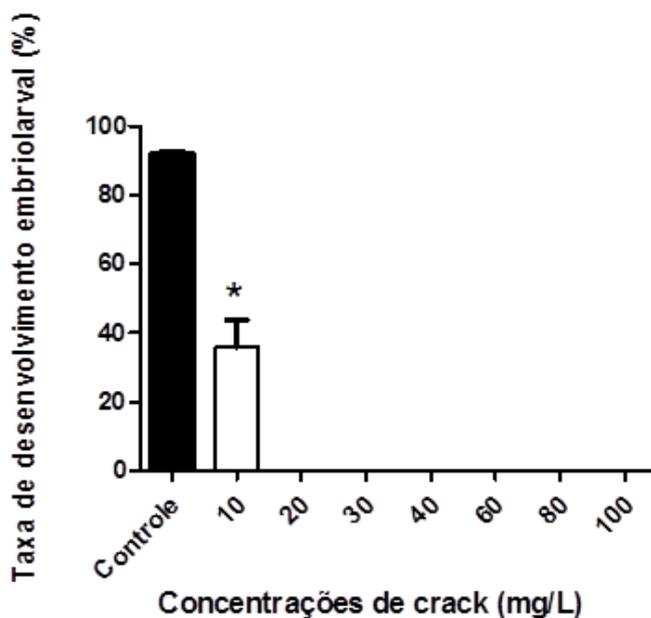


Figura 8 - Ensaio 1 - Resultados do ensaio de desenvolvimento embrionário. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 10; 20; 30; 40; 60; 80 e 100 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

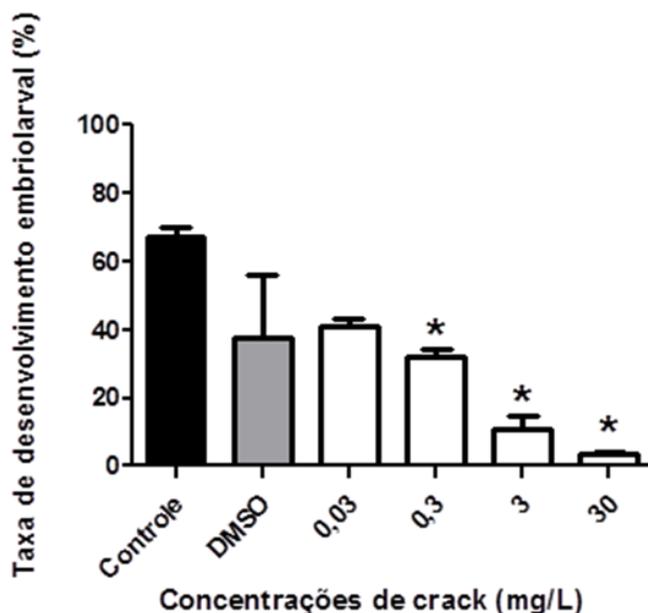


Figura 9 - Ensaio 2 - Resultados do ensaio de desenvolvimento embrionário. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 0,03; 0,3; 3 e 30 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

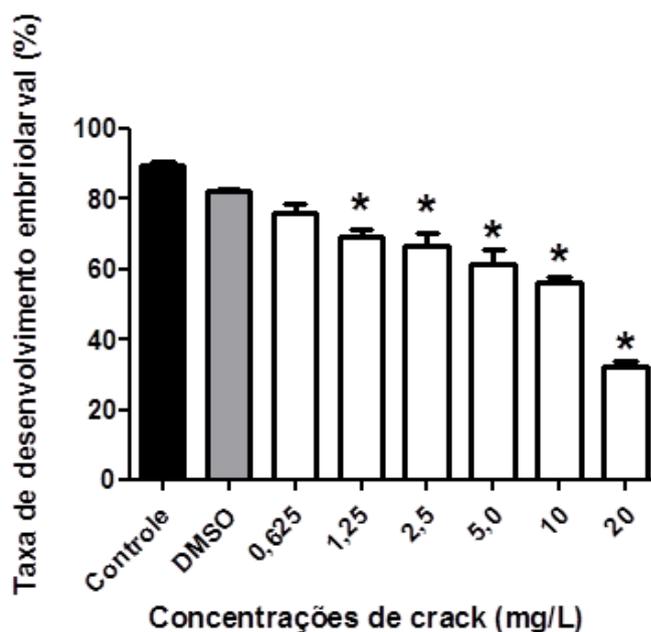


Figura 10 - Ensaio 3 - Resultados do ensaio de desenvolvimento embrionário. Os embriões foram expostos durante 48 horas às concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10 e 20 mg/L de crack. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Análise de toxicidade dos ensaios de fertilização e desenvolvimento embrionário realizadas em mexilhões *Perna perna* expostos às concentrações de crack (mg/L), expressos em CE_{50} , CENO e CEO.

Respostas	CE_{50} mg/L	CENO mg/L	CEO mg/L
Fertilização inibida (1h)	23,53	10,0	20,0
Desenvolvimento embrionário anormal (48h)	16,31	0,625	1,25

4.3 Ensaio de efeito citotóxico de crack (hemócitos)

Para o ensaio de estabilidade lisossomal de hemócitos através da aplicação do ensaio TRVCN, foram avaliadas as concentrações 0,5; 5; 50 e 500 $\mu\text{g/L}$ durante 48 horas e expressos os valores de CENO, CEO e CE_{50} . Durante o tempo de exposição, houve diferença significativa do TRVCN em relação ao controle em organismos expostos a concentrações de 5,0 - 500 $\mu\text{g/L}$ (FIG. 11).

Os efeitos na estabilidade da membrana lisossomal de hemócitos apresentaram um valor de CENO de 0,5 $\mu\text{g/L}$, enquanto que a CEO de 5 $\mu\text{g/L}$ (TAB. 7).

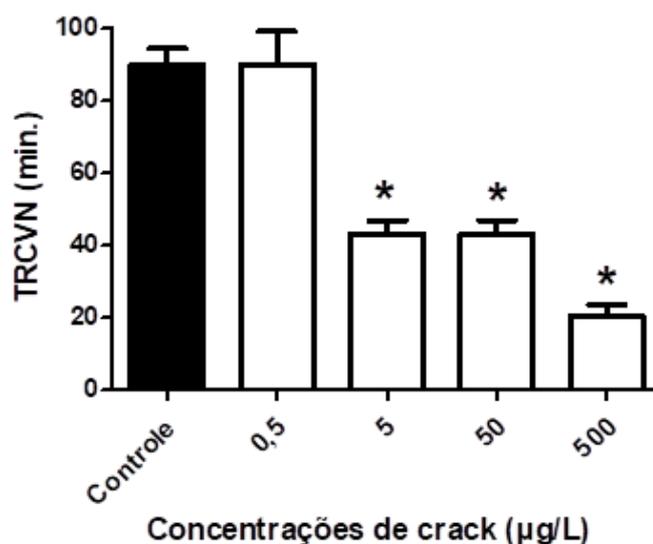


Figura 11 - Estabilidade da Membrana Lisossômica (EML) avaliada através do teste de tempo de retenção de corante Vermelho Neutro (TRCVN) em hemócitos de mexilhões *P. perna*. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Citotoxicidade de *crack* em hemócitos de mexilhões *Perna perna*. Expressos valores de CE_{50} , CENO e CEO em $\mu\text{g/L}$.

Resposta	CE_{50}	CENO	CEO
Estabilidade da membrana lisossômica	4,8	0,5	5,0

5. DISCUSSÃO

As drogas são produzidas para um efeito bioquímico específico e direcionado. Modos de ação específicos da cocaína e de seu subproduto o crack, são bem conhecidos em modelos biológicos de mamíferos, que não abordam necessariamente a mesma dose-resposta em organismos não-alvo. A cocaína é moderadamente lipofílica, o que facilita a passagem pelas membranas biológicas (VAN DER CARR, 1991) e representa um risco potencial para as comunidades aquáticas. Os dados sobre os riscos ambientais associados a esses compostos emergentes estão surgindo, mas ainda são extremamente escassos (MARANHO et al., 2017).

O presente estudo analisou os efeitos de *crack* em um organismo marinho não-alvo após uma exposição de curta duração (48h). A toxicidade em embriões do mexilhão *P. perna* ocorreu em concentrações na ordem de mg/L, sendo $CE_{50} = 23,53 \text{ mg/L} \pm 0,79$ para o ensaio de fertilização e $CE_{50} = 16,31 \text{ mg/L} \pm 0,48$ para o ensaio de desenvolvimento embriolarval, dados ainda não relatados em ambientes aquáticos para drogas ilícitas. No entanto, os efeitos biológicos adversos foram observados em concentrações ambientalmente relevantes quando analisados por meio de biomarcadores de danos (TRCVN).

Já a citotoxicidade foi avaliada através da estabilidade da membrana lisossômica, adotando os critérios previamente relatados para mexilhões *P. perna* (PEREIRA et al., 2011) e mariscos *R. philippinarum* (AGUIRRE-MARTINEZ et al., 2013). Os mexilhões foram considerados saudáveis quando o TRCVN foi ≥ 80 minutos; considerados estressados, porém com menor significância se o TRCVN estava entre 80 e 45 minutos, e em um estado estressado se o TRCVN fosse < 45 minutos. O *crack* foi capaz de produzir efeitos significativos após 48h de exposição a $5 \mu\text{g/L}$. Resultados semelhantes com teste de TRCVN, foram encontrados por BINELLI et al. (2012) em *D. polymorpha* expostos a concentrações de cocaína até $0,22 \mu\text{g/L}$. PAROLINI et al. (2013) também mostrou que 96 horas de exposição a $1 \mu\text{g/L}$ de benzoilecgonina (o principal metabolito humano de cocaína) afetou a estabilidade da membrana de lisossomos de hemócitos de *D. polymorpha*.

A título de comparação com outro alcaloide extremamente consumido, a cafeína é uma substância da classe das metilxantinas, e tem a capacidade de estimular o sistema nervoso central assim como a droga ilícita cocaína. Em estudos realizados por Santarossa (2017), o valor da CE_{50-48h} de cafeína foi de 229,71 mg/L. Com esse valor para a *D. magna* a cafeína é classificada na classe praticamente de não tóxicos, de acordo com Zucker (1985), e na classe pouco tóxicos, no sistema de classificação do potencial de periculosidade ambiental proposto pelo IBAMA (2015). Quando se compara as concentrações de cafeína do estudo de Santarossa (2017) com as concentrações de crack considerados tóxicos realizados nesse estudo ($CE_{50} = 23,53$ mg/L (fertilização) e $CE_{50} = 16,31$ mg/L (desenvolvimento embrionário), observa-se maior toxicidade do crack sobre as primeiras fases de vida do mexilhão *P. perna*.

Nos estudos de Bento (2015) com mexilhões *P. perna*, utilizando o fármaco fluoxetina, seguindo ao mesmo grupo das aminas em que se encontra a droga ilícita cocaína, foi observada a toxicidade aguda a partir de 2,25 mg/L (CE_{50} 48h) e toxicidade crônica a partir da concentração de 0,125 mg/L (CE_{50} 48h), sendo valores relativamente menores ao obtido neste estudo com a droga ilícita crack. A partir da avaliação de risco baseada na abordagem da legislação europeia a fluoxetina foi avaliada como muito tóxica e segundo os registros de concentrações ambientais a fluoxetina apresentou risco médio.

Em humanos, após a administração do crack através do fumo, o seu princípio ativo, que é a cocaína, é rapidamente absorvido pelos capilares pulmonares e segue para a corrente sanguínea. Sendo assim, a cocaína se distribui por todo o organismo e, devido à sua alta lipossolubilidade, atravessa a barreira hemato-encefálica e placentária, tendo especial afinidade pelo cérebro. A cocaína tem volume de distribuição de 2 mL/kg (CRESPO-FERNÁNDEZ et al. 2007). A biotransformação do princípio ativo inicia-se rapidamente no sangue devido ao pH do meio aquoso, o qual é potencializado por colinesterases e posteriormente se completa no fígado, onde é hidrolisada por colinesterases, produzindo seus metabólitos principais, a benzoilecgonina e a metil-éster de ecgonina. Outros metabólitos menores, como a norcocaína e o cocaetileno (metabólito gerado quando a cocaína é administrada com etanol), são também detectados em quantidades menores. A cocaína e seus metabólitos não se ligam às proteínas plasmáticas. A vida média de seus

metabólitos oscila entre 4 e 6 horas e é maior que a da cocaína livre, que é de aproximadamente 60 minutos (MOSQUERA et al. 2005; CRESPO-FERNÁNDEZ et al. 2007).

Os efeitos da cocaína em mamíferos como humanos e roedores podem ser explicados por sua ação em vários receptores, tais como: bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, exercendo seu efeito anestésico local, impedindo a condução de impulsos nervosos; atua na inibição da recaptação de dopamina, serotonina e noradrenalina a partir do bloqueio competitivo de seus transportadores (KIRLA et al. 2016). A cocaína exerce seus principais efeitos através dos sistemas dopaminérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos (BOGHDADI et al. 1997; LIZASOAIN et al. 2002). Sendo assim, no sistema dopaminérgico, o uso agudo impede a recaptação do neurotransmissor dopamina na célula pré-sináptica do sistema mesocorticolímbico dopaminérgico e aumenta, portanto, sua disponibilidade na fenda sináptica. Muitas das alterações comportamentais que provoca podem ser atribuídas a esse mecanismo de ação, porém também induz o aumento da síntese da dopamina (MOSQUERA et al. 2005; CRESPO-FERNÁNDEZ et al. 2007). Em contraste com esses efeitos agudos, o uso crônico de cocaína provoca esgotamento da dopamina na fenda sináptica.

Já no sistema adrenérgico, os dois metabólitos principais da cocaína, a benzoilecgonina e a ecgoninametilester, atuam como agonistas adrenérgicos diretos no bloqueio do sistema de transporte na membrana da célula nervosa, impedindo a recaptação dos neurotransmissores norepinefrina epinefrina na célula pré-sináptica, aumentando, portanto, a disponibilidade dessas substâncias na fenda sináptica.(MOSQUERA et al. 2005; CRESPO-FERNÁNDEZ et al. 2007, BOGHDADI et al. 1997). E por fim, sistema serotoninérgico ocorre a inibição da recaptação da serotonina e de seu precursor, o triptofano, dentro dos neurônios serotoninérgicos. Essa ação estimula os autorreceptores inibitórios pré-sinápticos, aumenta a concentração da serotonina na fenda e provoca retroalimentação negativa, esgotando-se rapidamente no cérebro. Em geral, o efeito sobre a serotonina é inibitório. Essa via serotoninérgica pode se relacionar aos efeitos alucinatórios e psicomiméticos produzidos pela cocaína, o que explica as alterações motoras e estereotípias. Essa ação sobre os transportadores aumenta a quantidade de

neurotransmissor na sinapse e estimulação sobre os receptores pós-sinápticos. Acredita-se que as propriedades de dependência e vício da cocaína estão relacionadas principalmente à inibição do transportador da dopamina (MOSQUERA et al. 2005).

Já nos estudos de Kirla et al. (2016), utilizando como organismo modelo o peixe zebra (*Danio rerio*), constataram que a cocaína absorvida através da pele e das brânquias, acumulou-se em maior quantidade nos olhos após um período de exposição de 48h em uma concentração de 50 μ M. O que levaram a hipótese de que a captura da cocaína ocorreu por meio dos melanócitos células que produzem o pigmento melanina, porém é um mecanismo até agora pouco explorado, mas sabe-se que o acúmulo de cocaína nessas células bloqueia a visão impedindo o organismo de manter uma locomoção eficaz. Também verificou-se que a cocaína atingiu o cérebro, mas em baixa quantidade, devido a forma de absorção por difusão passiva. Com esse achado, foi possível analisar que ao contrário do que ocorre em mamíferos, ou seja, sintomas de hiperatividade, nas larvas do peixe zebra foi constatada uma situação de hipoatividade (diminuição da locomoção), estando relacionada pelo fato da cocaína passar pela primeira vez através da brânquia e da pele, as quais atuando como barreiras e proporcionando ação anestésica local nos nervos periféricos, mais especificamente no bloqueio da tensão de canais de sódio em músculos e brânquias dificultando a locomoção e proporcionando efeitos anestésicos dominantes mesmo antes da cocaína poder atuar no cérebro.

Os efeitos do *crack* em invertebrados marinhos ainda são escassos, porém na literatura, relata-se que existem grandes concentrações de serotonina e L-dopamina (que é um neurotransmissor importante sendo derivado do aminoácido tirosina) em muitos tecidos de diversas espécies de moluscos marinhos, sendo estas substâncias responsáveis pelos controles dos processos biológicos de moluscos bivalves.

Nemcsók et al. (1997), constataram que a serotonina regula os períodos de filtração do mexilhão *Anodonta cygnea*, por meio da indução do relaxamento do músculo adutor, em oposição à noradrenalina, que exerce a contração deste músculo. Já nos estudos de Murakami et al. (1998), evidenciaram que a serotonina e a L-dopamina, podem causar o relaxamento do músculo adutor da

espécie *Mytilus edulis*. Ram et al. (1999), verificaram que a serotonina e a L-dopamina são responsáveis pelo relaxamento do sifão do mexilhão *Dreissena polymorfa*. Enquanto que Fong et al (1994) estimulou a maturação gonadal de *Dreissena polymorfa* por meio de injeção de serotonina.

Por meio destes dados da literatura, estima-se que o crack e a cocaína introduzidos no ambiente aquático possa interferir nas vias metabólicas dos organismos não-alvo, como o mexilhão *Perna perna*, causando perturbações no metabolismo, efeitos adversos e como resultado, riscos ambientais, aos quais foram constatados neste estudo no ensaio do TRCVN, indicando efeito estressor e danos na membrana lisossômica. Sendo assim, a relevância ecológica dos efeitos sobre a estabilidade da membrana lisossômica vem sendo estudada com o objetivo de identificar alterações fisiológicas em organismos expostos a xenobióticos, de forma que possa indicar quais os danos ocasionados a níveis celulares, e, conseqüentemente, avaliar os primeiros efeitos de contaminação ambiental.

Nos estudos de Moore et al. (2006) avaliou-se o sistema autofágico dos lisossomos ao qual parece ser um alvo comum para muitos poluentes ambientais, de modo que causa perturbação afetando a função normal da célula ocorrendo danos celulares como autofagia, atrofia epitelial, redução no crescimento e na reprodutividade e imunorreatividade. Por tanto, verifica-se que pelo fato da estabilidade da membrana lisossômica ser afetada por substâncias estressoras, a estabilidade dessas membranas são fatores importantes na indicação de “bem estar” celular e, conseqüentemente de risco ambiental. De acordo com OSPAR (2013), Ringwood et al. (2004) e Pereira et al. (2014), em estudos com organismos marinhos, submetidos a ensaios de estabilidade membrana lisossômica, avaliaram que com grande percentual de desestabilização da membrana celular, o desenvolvimento embriolarval dos organismos também pode ser afetado.

Nos estudos de citotoxicidade realizados por Dailianis et al. (2003) e Pereira et al. (2011), os danos na estabilidade da membrana lisossomal é uma condição pré-patológica, apresentando lesões como danos genéticos (incidência de micronúcleos ou quebras de cadeia de DNA), alterações bioquímicas relativas a enzimas antioxidantes, inchaço lisossômico, lipidose, lipofuscinosis e degeneração hepatopancreática em moluscos (MOORE et al.,

2006; PEREIRA et al., 2007, 2012). Essas avaliações esclarecem a importância da estabilidade da membrana lisossômica em avaliações de risco ambiental de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos.

Os nossos resultados mostraram efeitos subletais (citotoxicidade) na ordem de 5 µg/L de *crack* ou 2,02 µg/L de cocaína, destacando o risco ecológico de cocaína e seus subprodutos para ambientes marinhos. Binelli et al. (2012) observaram 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 (EMA, 2006), um Quociente de Risco (MEC / PNEC) superior a 1, denota risco e uma avaliação preliminar, a qual poderia ser realizada empregando a concentração média de cocaína encontrada na Baía de Santos (MEC) de 0,537 µg/L (PEREIRA et al., 2016) e a concentração sem efeito (PNEC = CENO / 10) de 0,202 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 descobertas 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 (MARANHO et al., 2017). 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. O presente estudo forneceu evidências sobre os riscos ecológicos do *crack* para os ecossistemas costeiros, sendo que futuras avaliações de bioacumulação e toxicidade crônica a organismos aquáticos expostos a drogas ilícitas devam ser realizadas.

6. CONCLUSÕES

Novas evidências sobre os riscos ecológicos da cocaína e seu subproduto, o *crack*, para os ecossistemas costeiros foram fornecidas. O presente estudo demonstrou efeitos tóxicos do *crack* sobre diferentes estágios de vida do mexilhão *P. perna* (fertilização e desenvolvimento embriolarval), com ênfase a citotoxicidade em concentrações realistas na ordem de µg/L. Este estudo tem caráter inovador pelo ineditismo do desenvolvimento de uma avaliação ecotoxicológica de drogas ilícitas empregando organismos marinhos, com a detecção de efeitos deletérios do composto estudado, fator primordial para avaliação de riscos ambientais de substâncias bioativas. Com as crescentes concentrações ambientais de cocaína e metabólitos, relatadas por estudos recentes deve-se incentivar pesquisas futuras sobre bioacumulação e deficiências fisiológicas causadas pela exposição prolongada de organismos aquáticos. É de extrema importância que os órgãos responsáveis pelo tratamento de esgotos possam revisar os protocolos de tratamentos e implantar tratamentos secundários como lodo ativado que evitem a introdução de cocaína e subprodutos nos ambientes aquáticos, minimizando efeitos negativos sobre a biota.

REFERÊNCIAS

- ABESSA, D.M.S.; CARR, R.S.; RACHID, B.R.F.; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A.; SARKIS, J.E. 2005. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Mar Poll Bull** 50, 875–885. 2005.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G.V.; BURATTI, S.; FABBRI, E.; DELVALLS, A.T.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. **J Environ Sci** 25 (7), 1408–1418.2013.
- ALYGIZAKIS, N.A.; GAGO-FERRERO, P.; BOROVA, V.L.; PAVLIDOU, A.; HATZIANESTIS, I.; NIKOLAOS, S.; THOMAIDIS, N.S. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. **Sci. Total Environ.** 541,1097–1105. 2016.
- ASTM - American Society of Testing and Materials. E724-89. Standard guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve mollusks. In: **Annual Book of ASTM Standards: Water and Environmental Technology**. Philadelphia, vol. 11, pp. 377-394. 1992.
- 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.
- BAKER, D.R.; OČENÁŠKOVÁ, 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.
- BENTO, N. R. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos Fluoxetina e Amoxicilina empregando o mexilhão marinho *Perna perna* (LINNAEUS 1758)**. 2015. Dissertação (mestrado). Universidade Santa Cecília, Santos, SP.
- BINELLI, A.; PEDRIALI, A.; RIVA, C.; PAROLINI, M. Illicit drugs as new environmental pollutants: Cytogenotoxic effects of cocaine on the biological model *Dreissena polymorpha*. **Chemosphere** 86 (9), 906–911. 2012.
- BOGHDADI, M.S; HENNING, R.J. **Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology**. Heart & Lung. 26, 466-83.1997.
- BOROVA, V.L.; MARAGOU, N.C.; GAGO-FERRERO, P.; PISTOS, C.; THOMAIDIS, N.S. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** 406 (17), 4273–4285. 2014.

BRASIL. **CONAMA, Resolução Federal N.º 357.** Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, 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.

BRASIL. **CONAMA, Resolução Federal N.º 430.** Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, A, P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações.** 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ** 247, 295–311. 2000.

CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; FANELLI, R. **Illicit drugs in the environment: occurrence, analysis, and fate using mass spectrometry.** Oxford: Wiley-Blackwell. 2011.

CESAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição /** - Universidade Santa Cecília - UNISANTA – Santos. São Paulo, Brasil. 37p. 1997.

CONCEIÇÃO, V.N.; SOUZA, L. M.; MERLO, B. B.; FILGUEIRAS, P. R.; POPPID, R. J ROMÃO, W. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. **Química Nova.** Vol. XY, n. 00, 1-7, 2014.

CORTEZ, F.S.; PEREIRA, C.D.S.; SANTOS, A.R.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; MARTINI, G.D.A.; BOHRERMOREL, M.B. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Environ Pollut** 168, 145-50. 2012.

CRESPO-FERNÁNDEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, C.A. Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. **Rev Latino-Am Psicol.** 39 (1), 83-107. 2007.

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G.P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V.K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research** 56, 443 e 470. 2003.

EMA - **European Medicines Agency Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use**. EMA/CHMP/SWP/4447/00. 2006.

FALCK, R.S.; WANG, J.; CARLSON, R.G. **Among long-term crack smokers, who avoids and who succumbs to cocaine addiction?** *Drug Alcohol Depend.* 98 (1-2), 24-29. 2008.

FERREIRA, A.; DOLDER, H. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochemica*, v. 105, p. 339-352, 2003.

FONG, P.P.; DUNCAN, J.; RAM, J.L. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia*. 50 (5), 506-509. 1994.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; LINDE, A.R. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, v. 12, p. 347- 354, 2008.

FREITAS, T.A.; PALAZZO, R.P.; DE ANDRADE, F.M.; REICHERT, C.L.; PECHANSKY, F.; KESSLER, F.; DE FARIAS, C.B.; DE ANDRADE G.G.; LEISTNER-SEGAL, S.; MALUF, S.W. Genomic instability in human lymphocytes from male users of crack cocaine. *Int J Environ Res Public Health* 11 (10), 10003–10015. 2014.

GHOSHDASTIDAR, A.J.; FOX, S.; TONG, A.Z. The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (1), 689–700. 2015.

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.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015. Sistema de classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental – PPA. http://www.ibama.gov.br/qualidadeambiental/classificacao_ppa (acesso 05.08.17).

JOHNSON, B. A.; AIT-DAOUD, N.; WANG, X. Q.; PENBERTHY, J. K.; JAVORS, M. A.; SENEVIRATNE, C.; LIU, L. Topiramate for the treatment of cocaine addiction. *AMA Psychiatry* 70 (12), 1338-1346. 2013.

KIRLA, K. T.; GROH, K. J.; STEUER, A. E.; POETZSCH, M.; BANOTE, R. K.; STADNICKA-MICHALAK, J.; EGGEN, R. I. L.; SCHIRMER, K.; KRAEMER, T. Zebrafish Larvae are Insensitive to stimulation by Cocaine: Importance of Exposure Route and Toxicokinetics. *Toxicological Sciences*, 154 (1), 183–193. 2016.

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.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C. S.; PINSKY, I.; MITSUHIRO, S.; CAETANO, R. **II LENAD - Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - O uso de maconha, cocaína e crack no Brasil.** Disponível em: http://www.inpad.org.br/images/stories/LENAD/lenad_maconhacocaina.pdf. 2012.

LIZASOAIN, I.; MORO, M.A.; LORENZO, P. **Cocaína: aspectos farmacológicos.** Adicciones. 14(1), 57-64. 2002.

LOWE, D.M.; PIPE, R.K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cell: in vitro study. **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 357-365, 1994.

LOWE, D. M.; SOVERCHIAI, 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.

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.

MARANHO, L.A.; DELVALLS, T.A.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. Assessing potential risks of wastewater discharges to benthic biota: An integrated approach to biomarker responses in clams (*Ruditapes philippinarum*) exposed under controlled conditions. **Mar Poll Bull** 92 (1-2), 11–24. 2015a.

MARANHO, L.A.; ANDRÉ, C.; DELVALLS, T.A.; GAGNÉ, F.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. Adverse effects of wastewater discharges in reproduction, energy budget, neuroendocrine and inflammation processes observed in marine clams *Ruditapes philippinarum*. **Estuar Coast Shelf Sci.** 164, 324-334. 2015b.

MARANHO, L.,A; *et al.* Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. **Environmental Research**, v. 134, p. 353-365, 2014a.

MARTÍN-DÍAZ, M.L.; BLASCO, J.; SALES, D.; DELVALLS, T.A. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. **Arch Environ Contam Toxicol** 53, 66–76. 2007.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; BENEDICTO, J.; CAMPILLO, J. A.; MOORE, M. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. **J. Environ. Monit.** 10, 490–499. 2008.

MAZUR, W. A. **Avaliação de risco ambiental do fármaco Paracetamol na Baía de Santos, SP.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Santa Cecília, Santos – SP.

METCALFE, C.; TINDALE K, L.I.H.; RODAYAN, A.; YARGEAU, V. Illicit drugs in Canadian municipal waste water and estimates of community drug use. **Environ Poll** 158 (10), 3179–85. 2010.

MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; SOMERFIELD, P.J.; Autophagy: role in surviving environmental stress. **Marine Environmental Research** 62, 420 e S425. 2006.

MORETTI, E.G.; YUJRA, V.Q.; CLAUDIO, S.R.; SILVA, M.J.; VILEGAS, W.; PEREIRA, C.D.S.; DE OLIVEIRA, F.; RIBEIRO, D.A. Acute *crack* cocaine exposure induces genetic damage in multiple organs of rats. **Environ Sci Pollut Res Int**, 1-9. 2016.

MOSQUERA, J.T.; MENÉNDEZ, M.C. Efectos toxicológicos y Neuropsiquiátricos producidos por consumo de cocaína. **Rev. Fac. Med. (Bogotá)**; 53 (1): 10-26. 2005.

MURAKAMI, H.; SANO, M.; TSUKIMURA, T.; YAMAZAKI, A. The relaxation induced by índole and nonindole 5-HT agonists in the molluscan smooth muscle. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 90 (1), 249-255. 1988.

NASCIMENTO A. I.; PEREIRA, S. A. & LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, A, P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações.** 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

NASCIMENTO A. I.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha – Aplicações no Brasil.** Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 91-97, 2002.

NEMCSÓK, J.; HIRIPI, L.; PATOCSKAI, M.; SALÁNSKI, J.; KUFKSÁK, O. The effects of pesticides on monoaminergic system related to periodic activity of mussels (*Anadontia cugnea*). **Gen. Pharmac.** 29, 79-83. 1997.

NORBERG-KING, T. **An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach.** National Effluent Toxicity Assessment Center. Technical Report 05 e 88. 1988.

OLIVEIRA, M.G.A.; DOS SANTOS, J.N.; CURY, P.R.; DA SILVA, V.H.; OLIVEIRA, N.R.; DA COSTA PADOVANI, R.; TUCCI, A.M.; RIBEIRO, D.A. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells of *crack* cocaine users. **Environ Sci Pollut Res Int** 21(8), 5760-5764. 2014.

OSPAR COMISSION: **Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013.** 2013.

PAROLINI, M.; MAGNI, S.; CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; BINELLI, A. Realistic mixture of illicit drugs impaired the oxidative status of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere** 128: 96–102. 2015.

PAROLINI, M.; PEDRIALI, A.; RIVA, C.; BINELLI, A. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Sci Total Environ** 444, 43–50. 2013.

PEREIRA, C. D. S. **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo**. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, C.D.S.; ABESSA, D.M.S.; BAINY, A.C.D.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.R.; BICEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T.H.; SOUSA, E.C.P.M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environ Toxicol Chem** 26, 462-469. 2007.

PEREIRA, C.D.S.; ABESSA, D.M.S.; CHOUERI, R.B.; ALMAGRO-PASTOR, V.; CESAR, A.; MARANHO, L.A.; MARTÍN- DÍAZ, M.L.; TORRES, R.J.; GUSSO-CHOUERI, P.K.; ALMEIDA, J.E.; CORTEZ, F.S.; MOZETO, A.A.; SILBINGER, H.L.N.; SOUSA, E.C.P.M.; DELVALLS, T.A.; BAINY, A.C.D. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: a multi-level approach. **Mar Environ Res** 96, 118-126. 2014.

PEREIRA, C.D.S.; MARANHÃO, 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.

PEREIRA, C.D.S.; MARTÍN-DÍAZ, M.L.; CATHARINO, M.G.M.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; TANIGUCHI, S.; ABESSA, D.M.S.; BÍCEGO, M.C.; VASCONCELLOS, M.B.A.; BAINY, A.C.D.; SOUSA, E.C.P.M.; DELVALLS, T.A. Chronic contamination assessment integrating biomarkers' responses in transplanted mussels: a seasonal monitoring. **Environ Toxicol** 27, 257-267. 2012.

PEREIRA, C.D.S.; MARTÍN-DÍAZ, M.L.; ZANETTE, J.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; ABESSA, D.M.S.; CATHARINO, M.G.M.; VASCONCELLOS, M.B.A.; BAINY, A.C.D.; SOUSA, E.C.P.M.; DELVALLS, T.A. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone. São Paulo, Brazil. **Ecotox Environ Saf** 74 (5), 1257–64. 2011.

PIPE, R.K. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 16, p. 111- 122, 1993.

RAM, J. L.; MOORE, D.; PUTCHAKAYALA, A. A.; MA, D.; CROLL, R. P. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 124, 211-220. 1999.

RAO, S.M.; REDDY, J.K. An overview of peroxisome proliferation-induced hepatocarcinogenesis. **Environ Health Perspect** 93, 205–209. 1991.

RINGWOOD, A. H.; HOGUET, J.; KEPPLER, C.; GIELAZYN, M. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters – *Crassostrea virginica*. **Marine Environmental Research.** v. 58, p. 151-155, 2004.

SANTAROSSA, M. A. S. **Contaminação de águas de pesque-pague por agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de cana-de-açúcar.** 2017. Tese (doutorado) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, São Paulo.

STEFANONI, M.F.; ABESSA, D.M.S. Lysosomal Membrane Stability of the brown mussel *Perna perna* (Linnaeus) (Mollusca, Bivalvia) exposed to the anionic surfactant Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS). **Pan- American Journal of Aquatic Sciences**, v.3, n. 1, p. 6-9, 2008.

UNODC (**United Nations Office on Drugs and Crime**), World Drug Report. United Nations publication, sales no. E.14. XI.7. 2014.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs).** Disponível em: <http://www.epa.gov/ppcp/faq.html#othersci>. 1991.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev** 27 (2), 120–139. 2009.

VAN DER CARR, L.D. Chapter 5. **Neuroendocrine effects of cocaine.** In: **Cocaine: pharmacology, physiology, and clinical strategies**, pp. 405. Eds. Galloway, MP, White, FJ, CRC Press, Florida, USA, 464p. 1991.

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.

WILLE, K.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J.V.; WULF, E.D.; CAETER, P.V.; JANSSEN, C.R.; BRABANDER, H.F.D.; VANHAECKE, L. And application of an LCMS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Anal Bioanal Chem** 397:1797–1808. 2010.

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.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. **USEPA Publication** 540/9-85-006, Washington, 17p.1985.

ANEXO I

Marine Pollution Bulletin 123 (2017) 410–414



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Baseline

Exposure to crack cocaine causes adverse effects on marine mussels *Perna perna*L.A. Maranhão^a, M.K. Fontes^a, A.S.S. Kamimura^b, C.R. Nobre^b, B.B. Moreno^a, F.H. Pusceddu^b, F.S. Cortez^b, D.T. Lebre^c, J.R. Marques^c, D.M.S. Abessa^d, D.A. Ribeiro^e, C.D.S. Pereira^{a,b,*}^a Departamento de Ciências do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Rua Dr. Carlos de Mendonça, 144, 11070-102 Santos, Brazil^b Laboratório de Ecotoxicologia, Universidade Santa Cecília, Rua Oswald Cruz 266, 11045-907 Santos, Brazil^c CEMSA – Centro de Espectrometria de Massa Aplicada, CIEPAC/IBEN, Av. Prof. Línea Pretos, 22-42, Sala 112 e 113, 05508-000 São Paulo, Brazil^d Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Infeante Dom Henrique, s/n, 11330-900 São Vicente, Brazil^e Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo, Av. Ana Costa 95, 11060-001 Santos, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Crack cocaine
Biomass
Cytotoxicity
Marine organisms

ABSTRACT

Our study aimed to evaluate crack cocaine effects in different life stages of the marine mussel *Perna perna*. For this purpose, fertilization rate, embryo-larval development, lysosomal membrane stability and DNA strand breaks were assessed. Effect concentrations in gametes and in larval development were found after 1 h ($IC_{50} = 23.53 \text{ mg l}^{-1}$) and 48 h ($IC_{50} = 16.31 \text{ mg l}^{-1}$), respectively. The highest tested concentration showing no acute toxicity (NOEC) was 10 mg l^{-1} , while the lowest observed effect concentration (LOEC) was 20 mg l^{-1} . NOEC concerning embryo-larval development was 0.625 mg l^{-1} , while the LOEC was 1.25 mg l^{-1} . Cytotoxic effects were evidenced in mussels exposed to crack cocaine concentrations ranging from 5 to $500 \mu\text{g l}^{-1}$. Our results report the first data on effects of an illicit drug to marine organisms and should encourage further ecotoxicological studies of these contaminants of emerging concern in coastal ecosystems.

Illicit drugs are a growing public health problem worldwide which cocaine and marijuana are the most consumed ones. The World Drug Report (UNODC, 2014) observed that the highest consumption of cocaine (including crack cocaine) occurs in the Americas. In North America, cocaine consumption has declined since 2006, partly due to a sustained shortage, although they are considered the largest consumers in the world. Illicit drug use has increased dramatically in the last decade in developing countries of South America (Johnson et al., 2013). The consumption and trafficking of cocaine in South America have become more prominent, particularly in Brazil, due to factors such as geographic location and the population increase clustered in urban centers. Brazilian cocaine users were estimated to be nearly 2 million in the 2004–2005 period, and this number rose to 3.35 million in 2012 (UNODC, 2014). Brazil has been reported as the world's largest market for crack cocaine (Laranjeira et al., 2012) and the main cocaine destination country in South America over the period 2010–2015 (UNODC, 2017).

The increase in illicit drugs consumption produces not only public health problems, but also induces potential environmental impacts since these contaminants of emerging concern were recently identified

as toxic for aquatic organisms (Binelli et al., 2012; Parolini et al., 2013).

Such compounds are continually released into the environment via wastewater treatment plants (WWTPs). Concerning freshwater environments, many studies have been published about real concentrations of cocaine in surface waters (Hernández et al., 2015; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013; Baker et al., 2012; Castiglioni et al., 2011; Metcalfe et al., 2010; Van Nuijs et al., 2009). However, few studies have analyzed estuarine and marine environments. Klosterhaus et al. (2013) found cocaine in seawater (2.4 ng l^{-1}), sediment ($0.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) and mussels ($0.3 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$) from San Francisco Bay (USA). Recently, Pereira et al. (2016) found higher concentrations of cocaine and benzoyllecgonine (537.0 ng l^{-1} and 20.8 ng l^{-1} , respectively) in seawater samples from Santos Bay (Brazil).

As pointed out by Binelli et al. (2012), although some researchers have focused on the development of reliable methodologies to quantify illicit drug concentrations in aquatic environments, few data are available on the acute or chronic effects of these compounds on the aquatic community. Cytotoxic effects were detected in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) exposed to environmentally relevant concentrations of cocaine (Binelli et al., 2012), benzoyllecgonine

* Corresponding author at: Departamento de Ciências do Mar, UNESP - Campus Baixada Santista, Brazil.
Email address: casillo.santos@unifesp.br (C.D.S. Pereira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.043>

Received 29 April 2017; Received in revised form 11 August 2017; Accepted 17 August 2017
Available online 23 August 2017

0025-326X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Figura 12 - Artigo referente a este estudo, publicado no periódico *Marine Pollution Bulletin*.