



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

JÚLIA DE ARAGÃO SOARES GRIZ

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO LIXIVIADO DE BITUCAS DE CIGARRO SOBRE
O MEXILHÃO *Mytella charruana*

RECIFE

2024

JÚLIA DE ARAGÃO SOARES GRIZ

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO LIXIVIADO DE BITUCAS DE CIGARRO SOBRE
O MEXILHÃO *Mytella charruana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Oceanografia.

Área de concentração: Oceanografia Química

Orientadora: Prof. Dra. Eliete Zanardi Lamardo.

Co-Orientador: Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Griz, Julia de Arago Soares.

Avaliação da toxicidade do lixiviado de bitucas de cigarro sobre o mexilhão *Mytella charruana* / Julia de Arago Soares Griz. - Recife, 2024.

74f.: il.

Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2024.

Orientação: Eliete Zanardi-Lamardo.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; 2. Metais traço; 3. Estabilidade da membrana lisossômica; 4. Experimento de exposição. I. Zanardi-Lamardo, Eliete. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ATA DA QUADRIGÉNTESIMA TRIGÉSIMA QUARTA (434ª) DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA DO CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, REALIZADA NO DIA 12 DE ABRIL DE 2024.

Ao décimo segundo dia do mês de abril de dois mil e vinte quatro (12/04/2024), às 09:30h (nove horas e trinta minutos), através de videoconferência, teve início, em sessão pública, a defesa da dissertação intitulada: “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO LIXIVIADO DE BITUCAS DE CIGARRO SOBRE O MEXILHÃO *Mytella charruana*” da discente **JULIA DE ARAGÃO SOARES GRIZ**, na Área de Concentração: Oceanografia Abiótica sob a orientação da Dra. ELIETE ZANARDI LAMARDO e coorientação do Dr. Ítalo Braga de Castro (IMAR-UNIFESP). A referida discente cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de Mestre em Oceanografia. A Banca Examinadora foi aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Oceanografia da UFPE em 12 de março de 2024, ficando composta pelos seguintes membros doutores: ELIETE ZANARDI LAMARDO (PPGO – UFPE), GILVAN TAKESHI YOGUI (PPGO – UFPE) e RODRIGO BRASIL CHOUERI (IMAR - UNIFESP), como titulares; e MANUEL DE JESUS FLORES MONTES (PPGO – UFPE) e LUCAS BURUAEM MOREIRA (IMAR-UNIFESP), como suplentes. Cumpridas as formalidades, a mestranda foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Dissertação. Concluída a explanação, a mestranda foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou e concedeu a mesma a menção APROVADA. Para a obtenção do grau de Mestre em Oceanografia, o mestrando deverá ter cumprido todas às demais exigências estabelecidas no Regimento Interno e Normativas Internas do Programa, nas Resoluções e Portarias dos Órgãos Deliberativos Superiores, assim como no Estatuto e no Regimento Geral da Universidade, observando os prazos e procedimentos vigentes nas normas.

Recife, 12 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA

ELIETE ZANARDI LAMARDO

Documento assinado digitalmente
 **ELIETE ZANARDI LAMARDO**
Data: 12/04/2024 12:05:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

GILVAN TAKESHI YOGUI

Documento assinado digitalmente
 **GILVAN TAKESHI YOGUI**
Data: 12/04/2024 12:50:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RODRIGO BRASIL CHOUERI

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO BRASIL CHOUERI**
Data: 12/04/2024 14:21:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestrando (a): **JULIA DE ARAGÃO SOARES GRIZ**

Documento assinado digitalmente
 **JULIA DE ARAGAO SOARES GRIZ**
Data: 15/04/2024 11:27:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

À minha amada família.
A todos aqueles que me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Giovanni e Renata, que sempre me incentivaram e me apoiaram em tudo. Vocês são absolutamente indispensáveis na minha vida e toda conquista minha tem um pedaço enorme de vocês!

A Moisés por todo amor, carinho e fé que você deposita em mim todos os dias! Você é um porto seguro em momentos de estresse e tensão e um impulsionador de todos os sonhos e metas que coloco em minha vida.

Às minhas irmãs, Carolina e Luiza, e ao meu cunhado, Guilherme, por sempre estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre me dando força. À Vovó Cleide, por todos os artigos, textos e vídeos de curiosidades marinhas que ela encontrava.

Essa gratidão estende-se à toda minha família, minhas sobrinhas (Olívia, Emília, Inês e mais uma pequena que ainda está por vir), minhas tias e minhas primas e primos. Serei para sempre grata por toda torcida e apoio dado nesse longo caminho.

À minha orientadora, Eliete Zanardi-Lamardo, por todos os ensinamentos e conselhos e por todo tempo, esforço, apoio e carinho que você dedicou ao meu aprendizado e desenvolvimento. A senhora é um ser ímpar e queria todo mundo ter uma mentora tão especial quanto você!

Ao meu co-orientador, Ítalo Braga de Castro, obrigada por me receber tão bem em São Paulo e por sempre estar disposto a me ajudar.

Ao Hytalo Rosas, minha imensa gratidão por toda ajuda durante o experimento, sem você realmente não teria conseguido fazer com que tudo corresse direitinho!

À Satie Taniguchi, por toda ajuda e direcionamento nas análises lá na USP.

Agradeço aos meus amigos do OrganoMAR (Bruna, Bruno, Fiamma, Gustavo, Nycolle e Roxanny) e da UFPE que juntos apoiamos uns aos outros por todos os perrengues. As minhas amigas maravilhosas (Bruna, Isabela e Nathalia) que mesmo de forma indireta estavam sempre me dando forças para seguir meu caminho.

Por fim, expresso meu agradecimento à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, através do fomento da bolsa (88887.678942/2022-00) e da fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento de parte desse projeto (19/13750-4) que tornou possível a realização do mesmo.

Cada um de vocês desempenhou um papel crucial neste processo, e estou profundamente grata por todas as contribuições.

Um **OBRIGADÃO** a todos não citados aqui que contribuíram para a melhora desse trabalho e dessa pessoa que aqui escreve. Todo apoio dado foi válido e muito apreciado!

*“... I say,
It’s the fire in my eyes,
And the flash of my teeth,
The swing in my waist,
And the joy in my feet.
I’M A WOMAN,
PHENOMENALLY...”*

Maya Angelou

RESUMO

A bituca de cigarro (BC) é um dos detritos mais recorrentes na composição geral dos resíduos sólidos descartados irregularmente em zonas costeiras, acarretando em potenciais fontes de contaminação. Os riscos associados a esse tipo de contaminação ainda não foram amplamente estudados e muitas lacunas no entendimento dos efeitos potenciais sobre a biota aquática precisam ser preenchidas. O presente estudo teve como objetivo avaliar os danos induzidos pela exposição de mexilhões da espécie *Mytella charruana* a lixiviados de BCs. Foram realizados dois experimentos considerando 24h (T₁) e 120h (T₂) de exposição em aquários de 20 L, contendo 16 mexilhões adultos em cada. Para obtenção das bitucas, os cigarros foram artificialmente fumados pelo emprego de uma bomba de vácuo de baixa pressão. Cinco diferentes tratamentos foram considerados, sendo um controle (TC), no qual os organismos foram expostos apenas à água do mar utilizada para diluição, e quatro diferentes concentrações, obtidas por diluições progressivas dos lixiviados: 0,01%, 0,1%, 1% e 10%. Ao final do período de exposição, sete organismos de cada aquário foram aleatoriamente selecionados para a avaliação da estabilidade da membrana lisossômica, através dos tempos de retenção do corante vermelho neutro (TRVN). A composição e concentração dos metais e dos HPA presentes na água do experimento e no tecido dos organismos foram determinadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial (GC-MS-MS), respectivamente. As concentrações desses contaminantes foram analisadas no lixiviado bruto, na água dos aquários (no início e fim dos experimentos) e no tecido dos organismos. No lixiviado, apenas o Cu, Fe e Zn foram quantificados em concentrações de 0,053, 0,045 e 0,060 mg L⁻¹, respectivamente. As concentrações destes elementos foram praticamente constantes nos dois experimentos e em todas as amostras analisadas. O ΣHPA no lixiviado foi de 2.149 ng L⁻¹, com predominância dos compostos de baixo peso molecular. Nos organismos, só foram detectados o fenantreno e o naftaleno com concentrações totais de 3,75 a 15,6 ng g⁻¹. Além da bioacumulação, outros processos físico-químicos contribuíram para a remoção dos HPA da coluna d'água. O TRVN variou de 0 a 120 minutos, para ambos os tempos de exposição. Foram encontradas diferenças significativas em todos os tratamentos em relação ao controle, exceto para a diluição de 1% no experimento T₁. No T₂ foi observada uma clara tendência de diminuição dos TR com o aumento da concentração do lixiviado. A concentração de HPA nos organismos apresentou uma correlação negativa com os TRVN. Os organismos expostos apresentaram alterações na membrana lisossômica em ambos os experimentos a partir da maior diluição (0,01%), sugerindo que uma única BC tem potencial para contaminar e impactar os organismos presentes em aproximadamente 2.500 L de água. A continuidade de estudos com BC é imprescindível para a plena compreensão dos reais efeitos que sua poluição pode causar no meio ambiente.

Palavras-chave: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; metais traço; estabilidade da membrana lisossômica; experimento de exposição

ABSTRACT

Cigarette butts (CBs) are one of the most common types of waste in the general composition of garbage discarded irregularly in coastal areas, resulting in potential sources of contamination. The risks associated with this type of contamination have not yet been widely studied and many gaps in understanding their potential effects on aquatic biota need to be addressed. This study evaluated exposure of the mussel *Mytella charruana* to CB leachates. Two experiments were carried out with 20 L aquariums, each containing 16 adult mussels that were exposed for 24 h (T₁) and 120 h (T₂). To obtain CBs, cigarettes were artificially smoked using a low-pressure vacuum pump. Five different treatments were set up: a control (CT), where the organisms were exposed to seawater, and four different concentrations prepared with progressive dilutions of the leachate (0.01, 0.1, 1 and 10%). At the end of the exposure time, 7 organisms from each aquarium were randomly selected for evaluating the lysosomal membrane stability through retention times of the neutral red dye (NRRT). Composition and concentration of metals and PAHs in both seawater and organisms were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS-MS), respectively. Concentrations of contaminants were analyzed in the raw leachate, aquarium seawater (at the beginning and end of the experiments) and tissue of the organisms. In the leachate, only Cu, Fe and Zn were quantitated at concentrations of 0.053, 0.045 and 0.060 mg L⁻¹, respectively. Such concentrations were nearly constant in both experiments and in all samples analyzed. The ΣPAHs in the leachate was 2,149 ng L⁻¹, with a prevalence of low molecular weight PAHs. In the organisms, only phenanthrene and naphthalene were detected, with total concentrations ranging from 3.75 to 15.6 ng g⁻¹. Physical-chemical processes other than bioaccumulation are likely removing PAHs from seawater. At both exposure times, NRRT varied from 0 to 120 min. Significant differences were found in all treatments when compared to the control, except 1% dilution in experiment T₁. In T₂, a clear trend of decreasing NRRT was observed with increasing leachate concentration. Concentration of PAHs in organisms exhibited a negative correlation with NRRT. The exposed organisms showed changes in the lysosomal membrane at both exposure times even in the most diluted treatment (0.01%), showing that a single CB has potential for contaminating and impacting organisms in approximately 2,500 L of seawater. Future studies with CBs are essential to fully understand the real effects their pollution can cause on the environment.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons; trace metals; lysosomal membrane stability; exposure experiment.

LISTA DE ABREVIÇÕES

%MA – Taxa de massa acumulada

AC – Acetato de celulose

ACE – Acenafteno

ACL – Acenaftileno

AN – Antraceno

As – Arsênio

B[a]A – Benz [a]antraceno

B[a]P – Benzo[a]pireno

B[b]F – Benzo[b]fluoranteno

B[e]P – Benzo[e]pireno

B[g,h,i]P – Benzo[ghi]perileno

B[k]F – Benzo[k]fluoranteno

BC – Bituca de cigarro

BTEX – Xileno

C1 CRI – C1 Crisenos

C1 FEN – C1 Fenantrenos

C1 FLU – C1 Fluorantenos

C1 NAFT – C1 Naftalenos

C1 PIR – C1 Pirenos

C2 CRI – C2 Crisenos

C2 FEN – C2 Fenantrenos

C2 FLU – C2 Fluorantenos

C2 NAFT – C2 Naftalenos

C2 PIR – C2 Pirenos

C3 NAFT – C3 Naftalenos

Cd – Cádmió

CG/MS/MS – Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas

Co – Cobalto

Cr – Crómio

CRI – Criseno

Cu – cobre

DB(ah)A

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FBC – Filtro de bituca de cigarro

Fe – ferro

FEN – Fenantreno

FLU - Fluorateno

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

Hg – mercúrio

HMW – Alto peso molecular

HNO₃ – Ácido nítrico

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

IC – Índice de condição

ICES – Conselho Internacional pela Exploração do Mar

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

IP – Indeno[1,2,3 - cd]pireno

K_{ow} – Coeficiente de Partição Octanol-Água

LMS – Estabilidade da membrana lisossômica

LMW – Baixo peso molecular

LQ – Limite de quantificação

MA – Massa acumulada

Mn – Manganês

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

NAET – Nitrosaminas específicas de tabaco

NAFT - Naftaleno

Ni – Níquel

OSPAR – Comissões de Oslo e Paris

Pb – Chumbo

PER – Perileno

PIR – Pireno

PNUMA – Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

TC – Tratamento Controle

UNEA – Assembleia das Nações Unidas pelo Meio Ambiente

USEPA – Agência de Proteção Ambiental Americana (United States Environmental Protection Agency)

VN – Corante Vermelho Neutro

Zn – Zinco

ΣHPA – Somatório de HPA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático dos componentes das bitucas de cigarro, cinzas, resíduo de tabaco não queimado, filtro e os diferentes papeis utilizados na produção do cigarro.	2
Figura 2. Estrutura molecular do acetato de celulose.	3
Figura 3. Estrutura molecular da nicotina.	5
Figura 4. Estrutura molecular de uma N-Nitrosamina que apresenta uma ligação entre os átomos de nitrogênio na qual um deles está ligado a dois grupos substituintes (R1 e R2) e o outro apresenta uma dupla ligação com o oxigênio.	6
Figura 5. Gráfico ilustrativo do desenvolvimento dos organismos em função da concentração dos metais essenciais e micropoluentes.	7
Figura 6. Estrutura molecular dos 16 HPA classificados pela USEPA como potencialmente causadores de danos ao meio ambiente.	9
Figura 7. Aquários de aclimatação dos mexilhões.	13
Figura 8. Desenho esquemático do sistema de bomba de vácuo para a queima artificial dos cigarros para obtenção das bitucas.	14
Figura 9. Desenho do experimento de exposição.	15
Figura 10. A. Aquários de exposição do tratamento de 1% do lixiviado para os tempos de exposição de 24h e 120h. B. Aquários de exposição do tratamento de 10% do lixiviado para ambos os tempos de exposição.	16
Figura 11. A. Com auxílio de uma tesoura, a concha é aberta. B. Utilizando uma seringa hipodérmica contendo 0,5mL de solução fisiológica é retirado 0,5mL de hemolinfa dos mexilhões. C. 40 µL da mistura de hemolinfa e solução fisiológica é colocada sobre uma lâmina. D. Retira-se o excesso de solução da lâmina para posterior coloração.	18
Figura 12. Programação da temperatura do forno para separação de HPA.	20
Figura 13. A. Índice de condição dos organismos utilizados nos experimentos de exposição. B. Comprimento dos organismos utilizados nos diferentes tratamentos do experimento de exposição.	23
Figura 15. Concentração de metais lixiviados das bitucas de cigarro. (*) elementos que apresentaram concentrações abaixo dos seus respectivos limites de quantificação.	27
Figura 16. Concentrações de HPA lixiviados de bitucas de cigarro.	28
Figura 17. A. Concentrações de As nos aquários de exposição em ambos os experimentos; B. Concentrações de Fe nos aquários de exposição em ambos os experimentos.	31
Figura 18. Concentrações do somatório de HPA na água dos aquários controle nos três tempos de exposição (T ₀ - 0h; T ₁ - 24h; T ₂ - 120h).	32

Figura 19. Concentrações de HPA na água dos aquários considerando as soluções preparadas com 10% do lixiviado. 33

Figura 20. Concentração de HPA acumulados nos organismos. 37

Figura 21.A. Relação da concentração de Σ HPA nos organismos e o tempo de retenção do corante vermelho neutro no experimento de 24 h (T_1); **B.** Relação da concentração de Σ HPA nos organismos e o tempo de retenção do corante vermelho neutro no experimento de 120h (T_2). .. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas morfométricas dos organismos utilizados durante o experimento de exposição.	22
Tabela 2. Concentração de metais no músculo dos organismos.	36
Tabela 3. Concentrações acumuladas do naftaleno e fenantreno no músculo dos organismos. ...	37

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais no lixiviado. ...	56
Tabela S2. Concentração dos metais nos aquários no momento T_0 de ambos os experimentos de exposição.....	57
Tabela S3. Concentração dos metais nos aquários ao final dos dois tempos de exposição.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EFEITOS ASSOCIADOS À BITUCAS.....	5
1.1.1 Nicotina.....	5
1.1.2 Nitrosamina.....	6
1.1.3 Metais traço.....	6
1.1.4 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	8
1.2 TESTES DE TOXICIDADE.....	10
1.3 PROPOSTA DA DISSERTAÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E METODOS.....	12
3.1 PREPARAÇÃO DOS LIXIVIADOS DE BITUCAS DE CIGARRO.....	13
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	14
3.3 ÍNDICE DE CONDIÇÃO.....	17
3.4 ESTABILIDADE DA MEMBRANA LISOSSÔMICA – LMS.....	17
3.5 ANÁLISES QUÍMICAS.....	17
3.5.1 Metais e Semimetal.....	18
3.5.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	19
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
4.1 ANÁLISE QUÍMICA DO LIXIVIADO.....	23
4.2 ANÁLISE QUÍMICA DOS AQUÁRIOS DE EXPOSIÇÃO.....	30
4.3. ANÁLISE QUÍMICA DOS ORGANISMOS.....	33
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	56

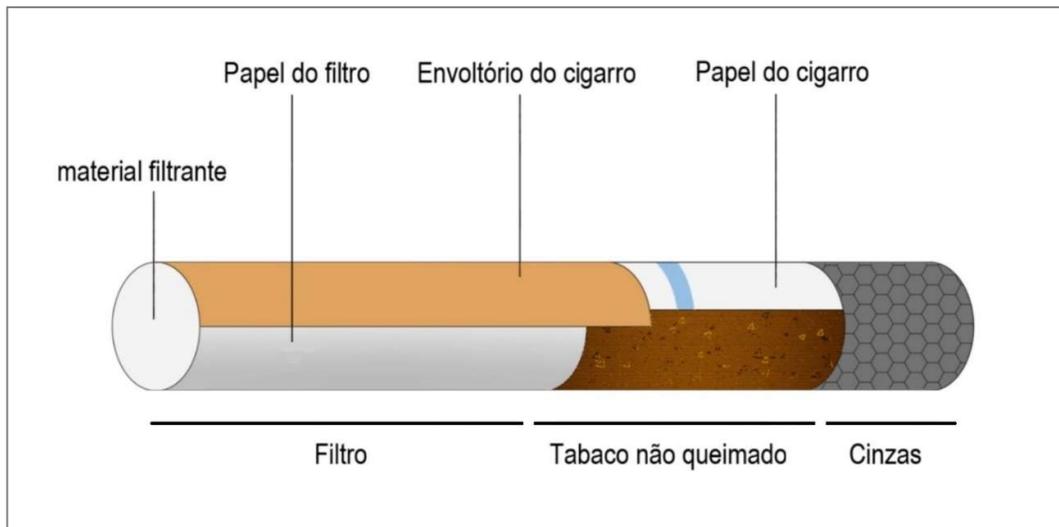
1. INTRODUÇÃO

Segundo o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), o lixo no mar é caracterizado como qualquer resíduo sólido persistente e manufaturado que foi descartado intencionalmente ou não em ambientes marinhos e costeiros, bem como itens que atingem os oceanos através de descargas de rios, esgotos, águas pluviais e ventos (UNEP, 2009). Inúmeros impactos ambientais têm afetado negativamente a biota aquática em decorrência dos aportes destes resíduos. Entre essas interações prejudiciais, o emaranhamento e aprisionamento, ingestão e consequente obstrução de tratos gastrointestinais, diminuição da taxa de reprodução, danos no crescimento populacional e introdução de espécies invasoras, são alguns dos mais frequentemente reportados (GARCÉS-ORDÓÑEZ *et al.*, 2020; NAPPER; THOMPSON, 2020; PATTIARATCHI *et al.*, 2022; WOODS *et al.*, 2021). Do mesmo modo, o lixo no mar também causa impactos econômicos pela perda de potencial turístico (CORRAINI *et al.*, 2018; GALL; THOMPSON, 2015; UNEP, 2016; ROCHMAN *et al.*, 2016). Em 2016, durante a Assembleia das Nações Unidas pelo Meio Ambiente (UNEA), os países membros reconheceram e juntaram esforços para identificar as rotas de entrada de lixo para o ambiente, a distribuição e as áreas criticamente afetadas (UNEP, 2016). Como resultado desses esforços, estudos científicos têm avaliado a ocorrência e a composição do lixo em diferentes ambientes marinhos e costeiros, como praias, coluna d'água, fundos oceânicos e até mesmo em organismos (GALGANI *et al.*, 2021; MACLEOD *et al.*, 2021; WAYMAN; NIEMANN, 2021).

Estes estudos têm indicado que a bituca de cigarro (BC), apesar de pequena, é um dos detritos mais recorrentes na composição geral do lixo descartado irregularmente em zonas costeiras (ARAÚJO; COSTA, 2019; NOVOTNY; SLAUGHTER, 2014). Nesse aspecto, é estimado que 75% dos 6 trilhões de cigarros consumidos anualmente no mundo, são descartados de forma inadequada no ambiente. Segundo dados da Ocean Conservancy (2012), esses resíduos constituem uma porcentagem considerável do lixo recolhido em campanhas de limpeza de praias (variando entre 19% e 38% dos resíduos contados), com densidades que podem variar de 2 a 38 BCs m⁻² (DOBARADAN *et al.*, 2017; KUNGSKULNITI *et al.*, 2018). Além disso em 2015, uma única campanha de limpeza de praia realizada ao redor do mundo, abrangendo voluntários de mais de 100 países, recolheu quase 14 milhões de itens, dos quais 2 milhões eram bitucas de cigarro (ARAÚJO; COSTA, 2019). No Brasil, estudos realizados nas praias da Baixada Santista, no litoral paulista, também encontraram as bitucas de cigarro entre os itens mais frequentes (LIMA *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Bancos de dados com informações globais sobre o lixo no mar, contabilizavam as BCs como um tipo de resíduo plástico. No entanto, considerando que esse resíduo é composto por pelo menos quatro materiais (cinzas, resíduos de tabaco não queimado, papel e filtro – Figura 1), BCs veem sendo incluídas como uma categoria própria (NOVOTNY *et al.*, 2009). Os filtros foram adicionados aos cigarros apenas em meados da década de 1950, depois que evidências científicas revelaram que cigarros causam sérios problemas de saúde humana. Sua função alegada é reduzir os teores de alcatrão e nicotina inalados pelos fumantes (NOVOTNY *et al.*, 2009). Entretanto, a eficácia destes filtros não é algo unânime entre pesquisadores e não há evidências claras que eles atuam para minimizar os danos à saúde relacionados ao ato de fumar (GREEN *et al.*, 2022; ITO *et al.*, 2011; NOVOTNY *et al.*, 2009; SANTOS - ENCHEANDÍA *et al.*, 2021). Em 2010, pesquisadores dos Estados Unidos e do Japão afirmaram que a presença dos filtros apenas alterou o tipo mais frequente de câncer pulmonar de carcinoma de células escamosas para adenocarcinoma (STELLMAN *et al.*, 1997).

Figura 1. Desenho esquemático dos componentes das bitucas de cigarro, cinzas, resíduo de tabaco não queimado, filtro e os diferentes papéis utilizados na produção do cigarro.

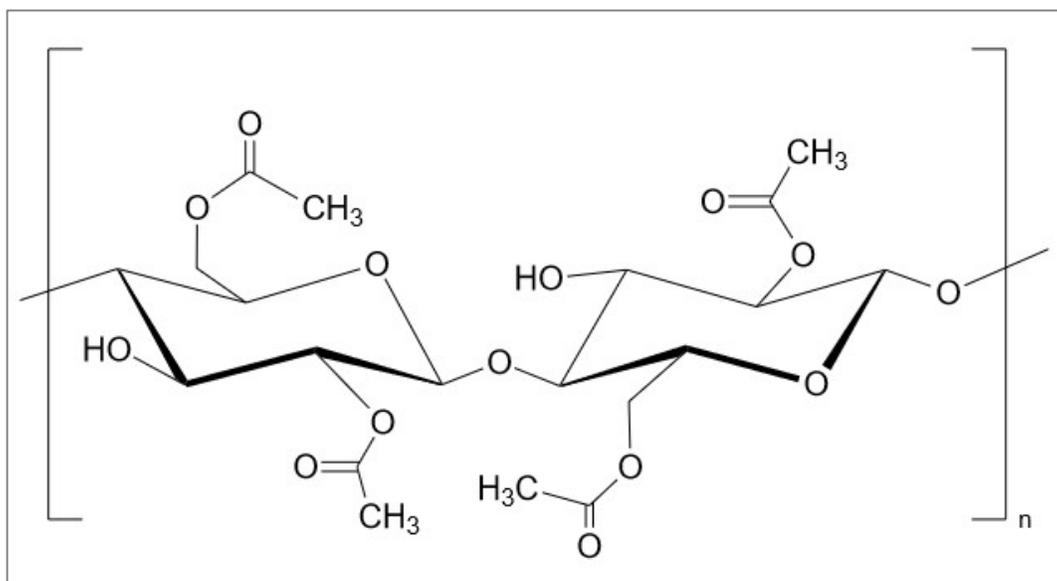


Fonte: A autora (2024)

Nas últimas décadas, os filtros se tornaram motivo de preocupação ambiental devido ao seu componente polimérico, as fibras de acetato de celulose (AC – HARRIS, 2011; ITO *et al.*, 2011). O AC (Figura 2) é um polímero produzido através da acetilação da celulose, pela adição de ácido acético e anidrido acético na presença de ácido sulfúrico (FISCHER, *et al.*, 2008). Embora a celulose seja biodegradável, a adição do grupo acetato em sua estrutura a converte em um material fibroso de difícil degradação em condições naturais. Apesar da radiação UV

promover a degradação do AC, a presença do envoltório de papel no filtro inibe a ação da radiação sobre as fibras (KURMUS; MOHAJERANI, 2020). Nesse sentido, alguns estudos têm apontado que a degradação do acetato de celulose pode acontecer em condições específicas com alta disponibilidade de luz solar, gerando pequenos fragmentos (<1mm) com persistência de pelo menos 18 meses (ACH, 2006; BONANOMI *et al.*, 2015; NOVOTNY *et al.*, 2009).

Figura 2. Estrutura molecular do acetato de celulose.



Fonte: A autora (2024)

Em adição à elevada persistência ambiental, as fibras de AC derivadas do cigarro fumado podem estar associadas com mais de 7.000 substâncias químicas (NOVOTNY; SLAUGHTER, 2014). Entre estas, a nicotina, nitrosaminas, compostos monoaromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), e alguns metais, são potencialmente tóxicos e trazem grande preocupação à saúde humana e ambiental. Cabe ainda ressaltar que muitas dessas substâncias são consideradas carcinogênicas e apresentam elevado potencial mutagênico (di GIACOMO *et al.*, 2016; SOLEIMANI *et al.*, 2023; WRIGHT *et al.*, 2015).

O descarte inadequado de BCs é uma das principais rotas de entrada para os ecossistemas marinhos e costeiros (LIMA *et al.*, 2021; NOVOTNY; SLAUGHTER, 2014). Desta forma, regiões apresentando considerável quantidade de BCs podem estar sujeitas a riscos ecológicos, principalmente devido às substâncias lixiviadas desses resíduos (DOBARADARAN *et al.*, 2018). Embora alguns estudos tenham sido realizados, os riscos associados a esse tipo de contaminação ainda não foram amplamente estudados (ARAÚJO;

COSTA, 2019) e muitas lacunas no entendimento dos efeitos potenciais sobre a biota aquática precisam ser preenchidas.

A poluição ambiental, proveniente da contaminação das diferentes atividades antrópicas, seja de origem intencional ou não, é um dos desafios enfrentados por agências de proteção ambiental e de saúde pública nos últimos anos (KUPPUSAMY *et al.*, 2016; MADENJIAN *et al.*, 2020). Poluentes são substâncias orgânicas e/ou inorgânicas que após atingirem ambientes naturais e em determinadas concentrações, resultam em danos para saúde ou bem-estar dos organismos. O aporte dessas substâncias para ecossistemas aquáticos está frequentemente relacionado com atividades antrópicas, das mais distintas fontes, tais como atividades industriais, mineração, turísticas, portuárias e adensamentos urbano. Nesse contexto, resíduos sólidos e vários tipos de fármacos, metais, compostos orgânicos, como derivados do petróleo e pesticidas, estão entre os grupos mais comuns de materiais que podem levar à poluição do ar, solo e água (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2020; KUPPUSAMY *et al.*, 2016; MADENJIAN *et al.*, 2020).

A contaminação de ambientes aquáticos tem se tornado um grave problema, uma vez que muitas substâncias conhecidas por serem tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas têm sido encontradas com concentrações significativas em ambientes aquáticos (GARCIA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2022; SOARES, 2006; TIBURTIUS *et al.*, 2004). Além disso, a ampla distribuição, persistência ambiental, alta toxicidade, e a capacidade de alguns compostos de bioacumular e biomagnificar, convertem muitas dessas moléculas e resíduos em indutores contínuos de danos ambientais em escalas espaciais e temporais (LIU *et al.*, 2019).

Apesar de sua distribuição global, os resíduos sólidos depositados em ambientes marinhos passaram a chamar a atenção como potenciais poluentes somente nos últimos anos e, ainda assim, poucos são os conhecimentos disponíveis quanto às consequências de seu acúmulo nos diversos ecossistemas marinhos. Portanto, o que se sabe sobre os danos ecológicos e à saúde humana decorrentes do lixo marinho ainda é incipiente (UNEP, 2016). Em decorrência disso, diversos estudos científicos têm sido desenvolvidos para avaliar a composição, ocorrência e impactos desse lixo no ambiente aquático.

Como previamente mencionado, dentre a composição geral do lixo descartado de forma irregular em zonas costeiras, BCs vêm sendo encontradas em quantidades significativas (NOVOTNY; SLAUGHTER, 2014; VANAPALLI *et al.*, 2023). Os filtros presentes nas bitucas e cigarros já foram associados a diversas substâncias, ambientalmente perigosas (NOVOTNY;

SLAUGHTER, 2014), as quais são potencialmente lixiviadas ficando biodisponíveis aos organismos (DOBARADARAN *et al.*, 2018). Nesse contexto, estudos recentes demonstraram que tanto organismos de coluna d'água como organismos bentônicos podem estar sujeitos aos impactos decorrentes do aporte de BCs em sistemas aquáticos (LIMA *et al.*, 2021).

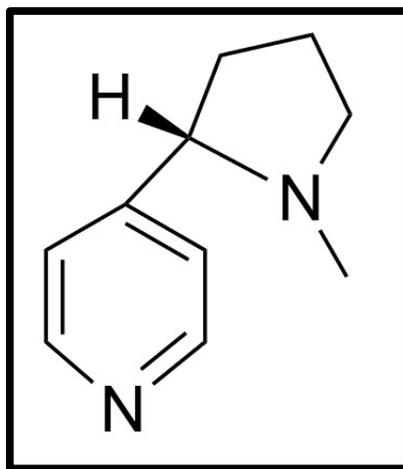
1.1 EFEITOS ASSOCIADOS ÀS BITUCAS

Diversos efeitos deletérios estão associados à exposição a bitucas de cigarro em decorrência dos mais de 7.000 compostos químicos presentes. Toda a cadeia produtiva do tabaco, incluindo sua plantação, produção e queima resultam na formação indireta ou não de uma gama extensa de contaminantes.

1.1.1 Nicotina

A nicotina (Figura 3), principal composto associado ao tabaco e um dos mais estudados em relação aos seus impactos em seres humanos, é classificada como um alcaloide do grupo amina (GREEN *et al.*, 2014). Além dos danos à saúde humana, a nicotina também já foi associada a efeitos deletérios em organismos aquáticos (DOBARADARAN *et al.*, 2021; KURMUS; MOHAJERANI, 2020; MONTALVÃO *et al.*, 2019). Ao mesmo tempo que a nicotina tem a capacidade de ser um inseticida eficaz, ela também levou à intoxicação e alterações comportamentais em organismos das espécies *Daphnia magna* e *Daphnia pulex* (LILIUS *et al.*, 1995), além de apresentar toxicidade aguda em três espécies de foraminíferos bentônicos, assim como estresse celular e a inibição da calcificação desses organismos (SABBATINI *et al.*, 2023).

Figura 3. Estrutura molecular da nicotina.

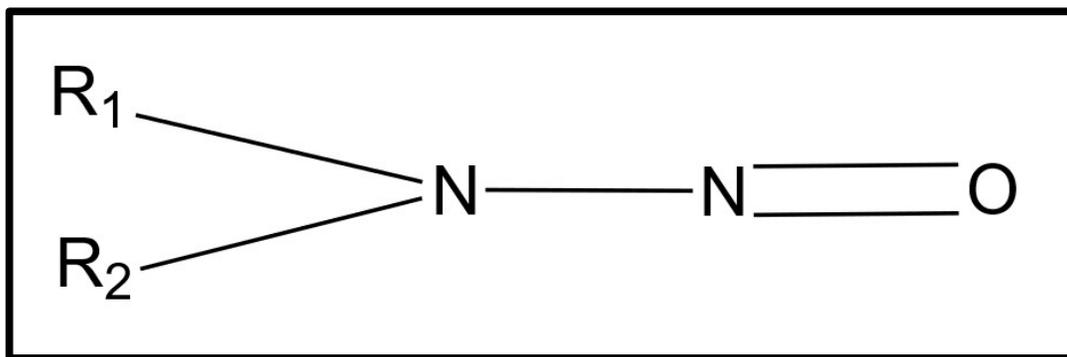


Fonte: A autora (2024)

1.1.2 Nitrosaminas

As N-nitrosaminas são um grupo de compostos que possuem um grupo nitroso ligado a um grupo amina (Figura 4 - HECHT, 1998). Esses compostos podem ser encontrados em matrizes como água, alimentos, materiais poliméricos (embalagens, brinquedos etc.) e tabaco. As nitrosaminas têm sido relacionadas ao desenvolvimento de câncer desde a década de 1950, sendo que mais de 90% dos compostos avaliados apresentaram ação carcinogênica em modelos animais (CARLSON *et al.*, 2017; HECHT, 1998). Existem algumas nitrosaminas que são formadas durante a produção do cigarro (cura, fermentação e/ou secagem), essas são chamadas de nitrosaminas específicas de tabaco (NAET) (LOURENÇO; OLIVEIRA, 1997). As NAET também já foram associadas a diversos tipos de câncer em mamíferos (HECHT, 1998), porém existe pouca informação sobre a toxicidade deste composto em organismos aquáticos.

Figura 4. Estrutura molecular de uma N-Nitrosamina que apresenta uma ligação entre os átomos de nitrogênio na qual um deles está ligado a dois grupos substituintes (R1 e R2) e o outro apresenta uma dupla ligação com o oxigênio.



Fonte: A autora (2024)

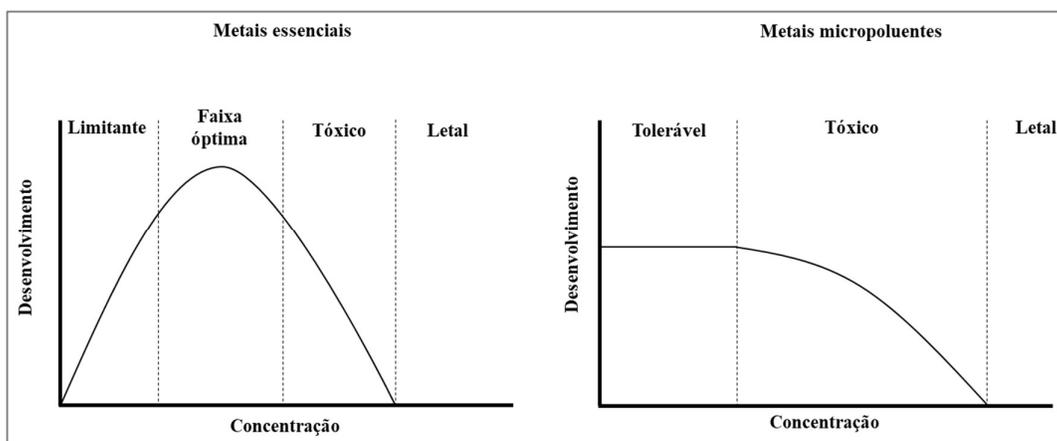
1.1.3 Metais traço

Os metais traço são um grupo de elementos naturais presentes na crosta terrestre que participam de diversos ciclos biogeoquímicos (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Dependendo da fase do ciclo, podem se concentrar em diferentes matrizes (água, sedimento e biota). Os metais podem atingir ambientes naturais através de diferentes processos (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Dentre as fontes naturais, a lixiviação do solo, a remobilização de sedimento, a decomposição da matéria orgânica, as atividades vulcânicas e o transporte eólico, são as mais comuns (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). As contribuições antrópicas de metais para o meio estão ligadas principalmente às atividades

industriais, queima de combustíveis fósseis e incineradores, efluentes domésticos e a agropecuária (YABE; OLIVEIRA, 1998).

Os metais podem ser classificados em dois grandes grupos: os essenciais e os micropoluentes (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Os chamados essenciais são aqueles que possuem funções catalisadoras em processos biológicos. Apesar de serem essenciais para o desenvolvimento, existe uma faixa ótima de concentração desses elementos; abaixo dela haverá uma carência nutricional, enquanto acima dela surgirá efeitos tóxicos nos organismos (Figura 5 - NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Dentre os metais essenciais, podemos citar cálcio, ferro, zinco, cobre e níquel. Já os metais considerados micropoluentes não apresentam nenhuma função metabólica conhecida, podendo ser tóxicos mesmo em baixas concentrações (Figura 5). O mercúrio, arsênio, chumbo, cádmio e estanho são os micropoluentes mais frequentemente estudados (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008).

Figura 5. Gráfico ilustrativo do desenvolvimento dos organismos em função da concentração dos metais essenciais e micropoluentes.



Fonte: A autora (2024)

Algo que diferencia os metais de outros tipos de contaminantes é sua persistência ambiental. Os metais não são degradáveis e tendem a se concentrar em sedimentos e organismos (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Alguns metais desse grupo também podem apresentar grande capacidade para biomagnificar. Dentre os metais traço, 11 são comumente encontrados em BC e seus lixiviados: arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), chumbo (Pb), cromo (Cr), ferro (Fe), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni) e zinco (Zn). Suas concentrações variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (ADORATI *et al.*, 2016;

AKHBARIZADEH *et al.*, 2021; DOBARADARAN *et al.*, 2017; MOERMAN; POTTS, 2011; POPPENDIECK *et al.*, 2016). As, Cd, Cr, Hg, e Pb são considerados micropoluentes e já foram correlacionados com diversos efeitos toxicológicos, tais como alterações enzimáticas, mudanças comportamentais e alterações no crescimento.

1.1.4 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos representam uma família de compostos orgânicos, formados por carbono e hidrogênio, que contêm dois ou mais anéis aromáticos condensados (MEIRE *et al.*, 2007). Os HPA são moléculas com baixa solubilidade em água, alto Kow (coeficiente de partição octanol-água), e grande tendência a se depositar e persistir nos sedimentos (BURNS *et al.*, 1994; LEVINGS *et al.*, 1997). A quantidade de anéis benzênicos é diretamente proporcional à afinidade lipofílica e inversamente proporcional à solubilidade em água (NETTO *et al.*, 2000; MEIRE *et al.*, 2007). O aumento do peso molecular e hidrofobicidade eleva a formação de complexos entre os HPA e a MO dissolvida, porém o aumento da salinidade diminui esta tendência (NEFF, 1985).

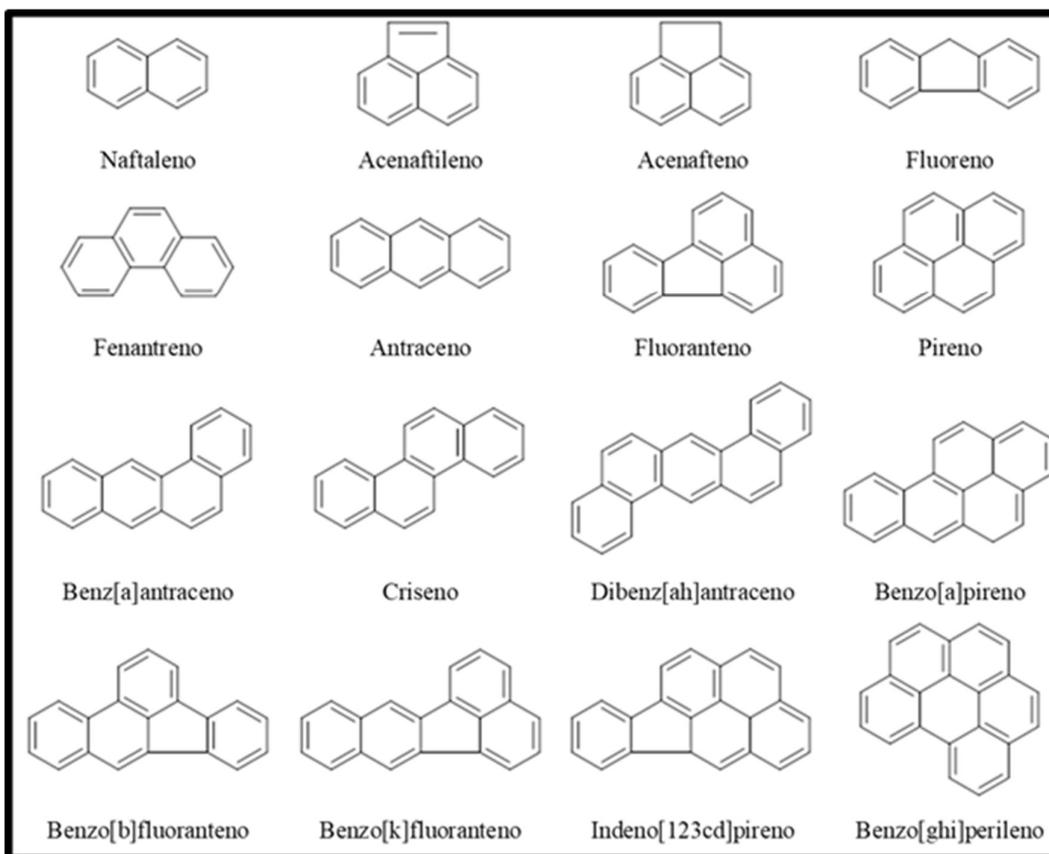
Os HPA se destacam por serem compostos relativamente estáveis, e persistentes no ambiente, e tendem a se acumular em tecidos de moluscos e crustáceos, além de apresentarem efeitos carcinogênicos e mutagênicos sobre várias espécies de organismos vivos (HARTMANN *et al.*, 2005; SAMANTA *et al.*, 2002). Os HPA de maior peso molecular são mais tóxicos; todavia deve-se considerar o ambiente que está sendo estudado. Na coluna d'água, os HPA mais leves (baixo peso molecular) causam maior dano aos organismos pelágicos por estarem mais biodisponíveis, devido à sua maior reatividade e solubilidade (BAPTISTA NETO, 2008). Por outro lado, os HPA de maior peso molecular causam maior toxicidade aos organismos bentônicos, pois devido à sua menor solubilidade, tendem a se depositar nos sedimentos ou acumular nos lipídios de organismos (NEFF, 1985).

Estudos ecotoxicológicos com peixes observaram alterações em atividades enzimáticas, aumento do tamanho de hepatócitos, mudanças nos tamanhos e locais das lamelas nas brânquias e presença de edemas, caracterizando mudanças histopatológicas e bioquímicas e alterações comportamentais e físicas, tais como diminuição da velocidade e da resistência natatória e diminuição da acuidade visual quando expostos a águas contaminadas por HPA (MELO, 2011; RIBEIRO, 2007). Experimentos com a espécie de copépoda *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) exposta a sedimento contaminado com HPA resultou em um decréscimo da fecundidade total desses organismos (TORREIRO-MELO, 2010). Em

organismos bivalves, os HPA já foram associados à diminuição de hemócitos, alteraram a composição hemática e inibiram a fagocitose de hemócitos, aumentaram a presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) e causaram danos ao DNA (SUN *et al.*, 2021). Além de afetar a biota, os HPA também estão relacionados com processos carcinogênicos no ser humano. Para a população humana, as principais rotas de absorção (ou rotas de entrada) de HPA são os alimentos contaminados e o ar atmosférico (NETTO *et al.*, 2000).

A Agência de Proteção Ambiental Americana classificou (USEPA) 16 HPA (Figura 6) como prioritários em estudos ambientais, considerando seu potencial tóxico ao meio ambiente: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, floureno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[123cd]pireno, dibenzo[ah]antraceno e benzo[ghi]perileno (MEIRE *et al.*, 2007).

Figura 6. Estrutura molecular dos 16 HPA classificados pela USEPA como potencialmente causadores de danos ao meio ambiente.



(Griz, 2021)

1.2 TESTES DE TOXICIDADE

Os testes de toxicidade são utilizados para quantificar os efeitos potencialmente adversos resultantes da exposição a substâncias tóxicas, analisando o grau tóxico sobre um determinado organismo (COSTA *et al.*, 2008). Resumidamente, eles consistem em expor em condições controladas, organismos ao contaminante em diferentes concentrações por um determinado tempo e observar reações predefinidas nos organismos, tais como mortalidade, alterações bioquímicas ou comportamentais. Nesses ensaios também são utilizados tratamentos controle permitindo a comparação com os tratamentos em que os organismos estão sendo expostos ao contaminante (NETO; WALLNER-KERSANACH, 2008). Os efeitos podem estar relacionados com a letalidade (efeito agudo) ou com respostas subletais (efeito crônico). Os testes podem ser classificados em termos de tempo de exposição ou diferentes níveis de efeitos a serem observados (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Em relação ao tempo de exposição, eles podem ser testes de toxicidade aguda ou crônica. Os testes que medem os efeitos agudos possuem tempos de exposição menores que 10% do ciclo de vida do organismo, enquanto os efeitos crônicos são observados após o tempo de exposição maior que 10% do ciclo de vida.

Entre as avaliações de toxicidade ambiental realizadas utilizando BCs, destaca-se o trabalho desenvolvido por Wright e colaboradores (2015), que analisaram diversos efeitos tóxicos das fibras, assim como do lixiviado de BCs, em poliquetas. Nesse estudo foram analisados danos genotóxicos utilizando o ensaio cometa e variações comportamentais e no peso. Outro estudo analisou mudanças no desenvolvimento de embriões de *Oryzias latipes* através da mortalidade e do acompanhamento das metamorfoses associadas ao desenvolvimento (LEE; LEE, 2015). De Souza Abessa *et al.*, (2021) observaram anomalias morfológicas em microcrustáceos após exposição a lixiviados de BCs.

A avaliação da estabilidade da membrana lisossômica vem sendo utilizada como um biomarcador celular generalizado de estresse à poluição, uma vez que os lisossomos são alvo de uma vasta gama de poluentes e estão presentes em todas as células nucleadas (NICHOLSON; LAM, 2005). Muitas substâncias tóxicas se acumulam nos lisossomos, podendo causar perturbação e danos à membrana lisossomal (MOORE *et al.*, 2006). A estabilidade destas membranas pode ser avaliada através do método chamado de “tempo de retenção do vermelho neutro”, que consiste em expor células da hemolinfa dos organismos ao corante vermelho neutro (VN). Esta técnica se baseia na hipótese que células saudáveis retêm o VN por mais tempo que células danificadas.

Estudos ecotoxicológicos dessa natureza demandam a utilização de organismos para avaliar os efeitos de diferentes estressores ambientais. Para os ecossistemas marinhos, moluscos bivalves têm sido amplamente utilizados como espécies sentinelas devido às suas características, como extensa distribuição geográfica, abundância, acessibilidade no campo, além de sua importância ecológica e econômica (CATHERINE *et al.*, 2016). Além disso, o hábito alimentar filtrador, o comportamento sésil e a alta capacidade de bioacumular contaminantes em seus tecidos, convertem moluscos bivalves filtradores em biomonitores ideais para estudos de contaminação e consequente poluição em ambientes costeiros (LÜCHMANN, *et al.*, 2015).

Conhecido popularmente como sururu, *Mytella charruana* (Bivalvia: Mytillidae) é um organismo do filo Mollusca, calcificante, consumidor primário que representa um componente importante da teia trófica do ecossistema estuarino (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1983). Devido ao hábito de ficarem semienterrados nos sedimentos em regiões estuarinas, podem indicar a condição de qualidade da coluna d'água e do substrato ao qual estão associados (NARCHI; GALVÃO-BUENO, 1983). Essa espécie é um importante recurso pesqueiro por seu rápido crescimento e resistência às variações nas condições físico-químicas do ambiente (SANTOS, 2021). Ela também vem sendo utilizada em diversos estudos, como bioindicadora de contaminação pelo emprego de diferentes análises ecotoxicológicas, entre elas, o tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos (ARAUJO, 2022; LARANJEIRA, 2019; PUSCEDDU, 2016; SANTOS, 2021).

1.3 PROPOSTA DA DISSERTAÇÃO

Considerando o caráter emergente da contaminação de zonas marinhas e costeiras por BCs, assim como a ausência de estudos investigando respostas biológicas destes resíduos sobre organismos filtradores de importância ecológica e econômica, o presente projeto tem como objetivo avaliar os danos induzidos pela exposição a lixiviados de BCs sobre moluscos bivalves. Este estudo está fundamentado na hipótese de que diferentes concentrações dos lixiviados de BCs e os tempos de exposição são parâmetros importantes na indução de efeitos.

Organismos bentônicos são importantes recursos utilizados na ecotoxicologia como bioindicadores (BRANDIMARTE *et al.*, 2005). Normalmente possuem baixa mobilidade estando expostos e refletindo as condições ambientais dos locais onde habitam. Mexilhões são bivalves aquáticos filtradores bastante susceptíveis a contaminantes presentes na água e no sedimento, além de serem capazes de concentrar e bioacumular substâncias tóxicas presentes

nessas matrizes ambientais (RODRIGUES-ARIZA *et al.*, 1992). Apesar disso, nenhum estudo realizado até o momento avaliou os impactos potenciais de BCs, inadequadamente descartadas, sobre esses organismos. Nesse aspecto, cabe salientar que as BCs, mesmo em pequenas quantidades, podem induzir efeitos deletérios e levar à acumulação de substâncias perigosas sobre esses animais habitantes de zonas estuarinas. Além disso, considerando a importância econômica dessas espécies, que servem muitas vezes de fonte importante de proteína para as comunidades locais, o presente estudo é relevante.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos de lixiviados de bitucas de cigarro sobre mexilhões da espécie *Mytella charruana*, investigando as alterações na membrana lisossômica destes organismos. Para tanto, as etapas apresentadas abaixo foram desenvolvidas para atingir o objetivo principal.

- Investigar as alterações no estado geral de saúde destes organismos através da estabilidade da membrana lisossômica – com base no tempo de retenção do corante vermelho neutro.

- Analisar e quantificar a concentração de metais e HPA nos tecidos dos organismos expostos aos lixiviados.

- Correlacionar a presença de contaminantes com os efeitos ecotoxicológicos observados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os mexilhões utilizados nos experimentos de exposição a lixiviados de BCs foram da espécie *Mytella charruana*, adquiridos de uma fazenda de cultivo estabelecida no interior da Reserva Extrativista do Mandira (Cananéia - SP). Os mexilhões foram aclimatados em tanques contendo água do mar previamente filtrada e obtida em área isenta de contaminação (Figura 7). O período de aclimação foi de três dias e a água dos tanques foi mantida sob constante filtração biológica e vigorosa aeração. Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e controlados: salinidade - 26, pH – 7,5, temperatura - 25°C e um fotoperíodo de 12h de escuro e 12h de luz. Os mexilhões foram alimentados com 2 mL de concentrado de fitoplâncton marinho com tamanho entre 4-10 µm (PhytogoldS – Brightwell) a cada dois dias.

Figura 7. Aquários de aclimação dos mexilhões.

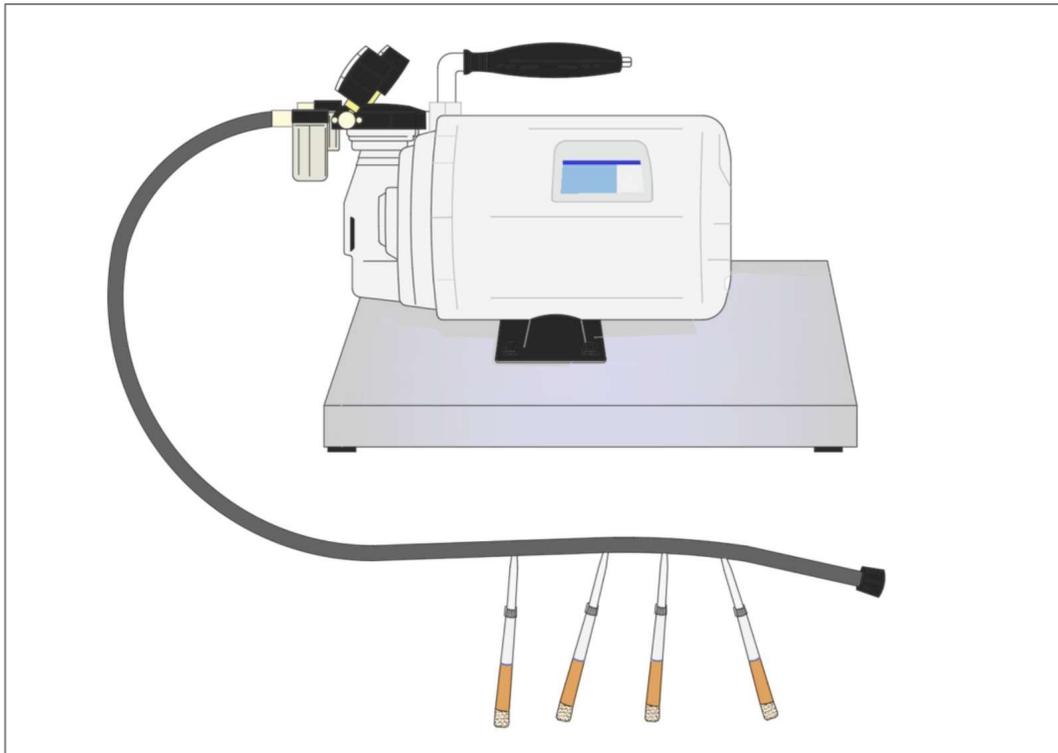


Fonte: A autora (2022)

3.1 PREPARAÇÃO DOS LIXIVIADOS DE BITUCAS DE CIGARRO

Os pacotes de cigarro foram adquiridos em estabelecimentos comerciais, levando em consideração a marca dos cigarros mais frequentemente encontrada em amostras das praias de Santos. Para obtenção das bitucas, os cigarros foram artificialmente fumados pelo emprego de uma bomba de vácuo de baixa pressão, com um ciclo de 8s de queima ativa e 45s de queima passiva simulando o ato natural de fumar (Figura 8). A queima foi interrompida usando água ultrapura, de modo a manter aproximadamente 1 cm de resíduos de tabaco em cada BC. Foram adicionados quatro BCs por litro de água do mar reconstituída (salinidade 25) e os frascos foram agitados por 24 horas em agitador orbital. Os lixiviados obtidos foram filtrados usando um filtro de fibra de vidro de 0,7 μm visando a remoção do material particulado. Estas soluções de lixiviados foram utilizadas para a preparação dos experimentos de exposição.

Figura 8. Desenho esquemático do sistema de bomba de vácuo para a queima artificial dos cigarros para obtenção das bitucas.



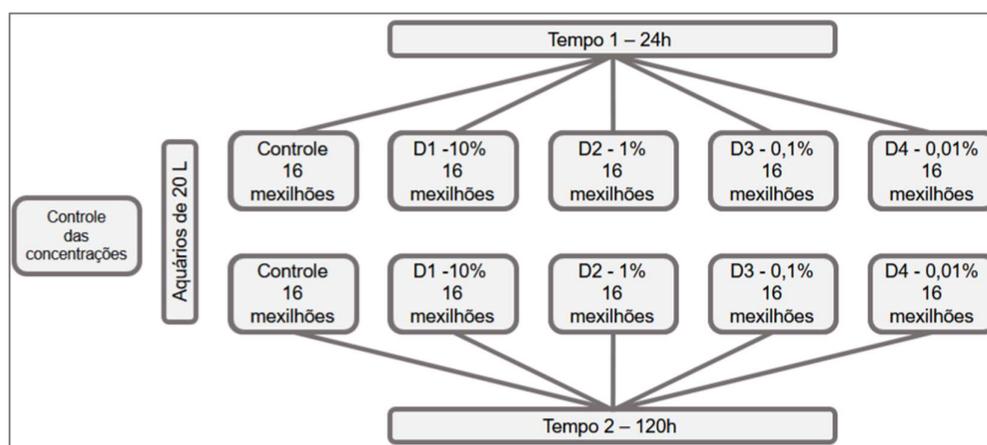
Fonte: A autora (2024)

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em aquários de 20 L, contendo 16 mexilhões adultos em cada. Foram considerados 5 diferentes concentrações dos lixiviados preparados a partir das BCs, sendo 4 diluições progressivas dos lixiviados nas concentrações 0,01%, 0,1%, 1% e 10% (Figuras 9 e 10). O quinto tratamento foi o controle (TC), onde os organismos foram expostos apenas à água do mar utilizada para diluição. Os tempos de exposição considerados nos experimentos foram 24 e 120 horas. As amostras de água dos aquários foram coletadas ao final de cada tratamento (tempo de exposição vs. concentração) para posterior quantificação dos HPA e metais. Um aquário adicional com a concentração de 10% do lixiviado e sem a adição dos organismos foi mantido ao longo dos experimentos para observar possíveis variações da concentração dos compostos devido a processos de aderência às paredes do aquário, fotodegradação e/ou ação microbiológica.

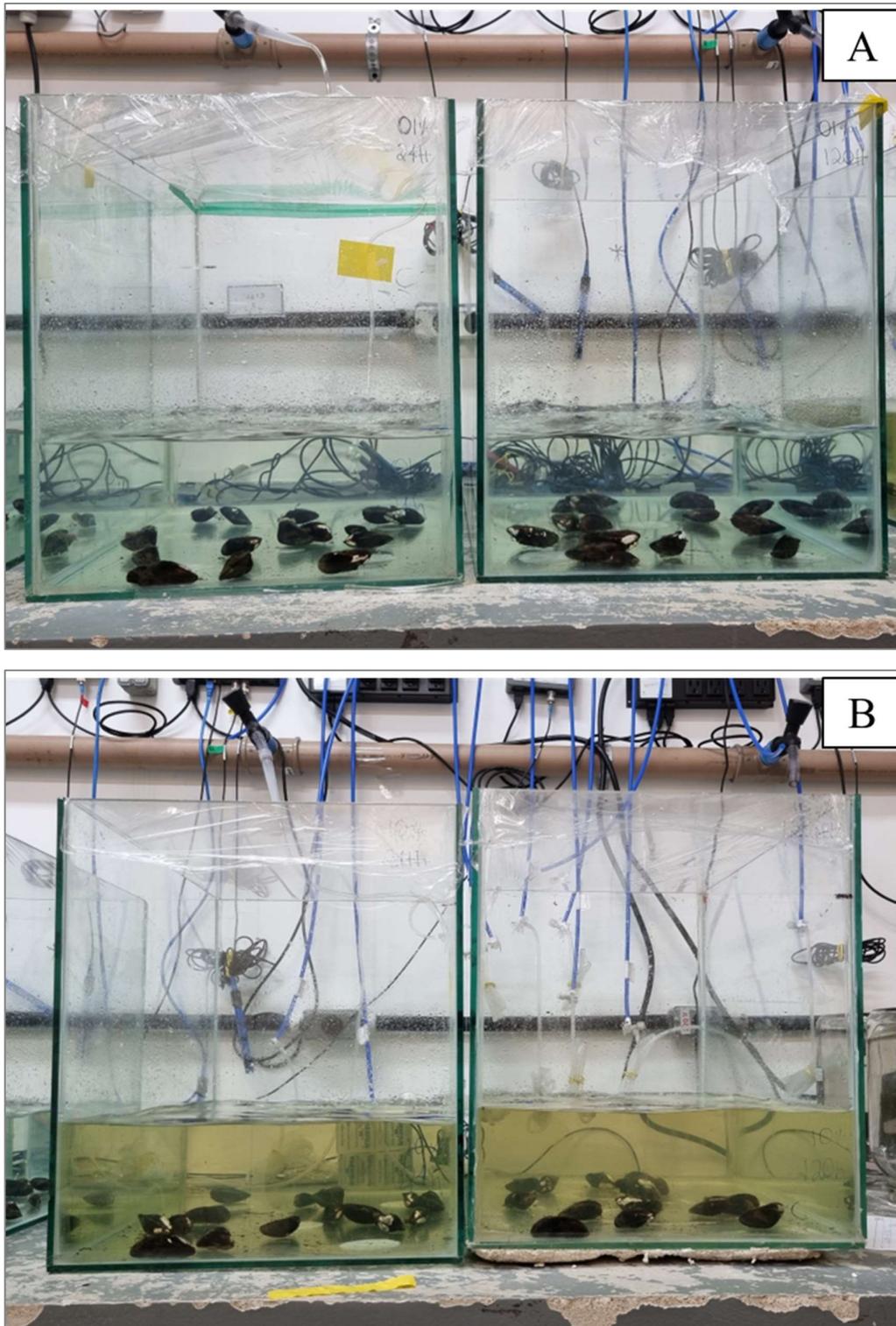
A mortalidade de organismos foi monitorada durante todo o experimento. Ao final de cada período de exposição, 7 organismos de cada aquário foram aleatoriamente selecionados para a avaliação da estabilidade da membrana lisossômica, através dos tempos de retenção do corante vermelho neutro. Os tecidos e os organismos restantes foram armazenados em frascos de vidro previamente descontaminados para análise de metais e HPA. As medidas morfométricas (altura, comprimento e largura) foram obtidas, assim como o peso (com e sem concha) de todos os organismos com o objetivo de calcular índices de condição de saúde dos organismos utilizados no teste do vermelho neutro.

Figura 9. Desenho do experimento de exposição.



Fonte: A autora (2024)

Figura 10. A. Aquários de exposição do tratamento de 1% do lixiviado para os tempos de exposição de 24h e 120h. B. Aquários de exposição do tratamento de 10% do lixiviado para ambos os tempos de exposição.



Fonte: A autora (2022)

3.3 ÍNDICE DE CONDIÇÃO

O índice de condição (IC) é uma ferramenta útil para se analisar aspectos nutricionais de um organismo, considerando gastos e acúmulos de reservas energéticas, as quais podem influenciar a bioacumulação de contaminantes (LAWRENCE; SCOTT, 1982). No presente estudo, os ICs foram calculados para todos os organismos pela razão entre a massa mole e a massa total dos indivíduos. Essa abordagem, tem sido bastante utilizada nas análises de bivalves para medir a saúde geral, crescimento, rendimento de carne, maturidade sexual e efeitos de estresses ambiental (ZENG; YANG, 2020).

3.4 ESTABILIDADE DA MEMBRANA LISOSSÔMICA – LMS

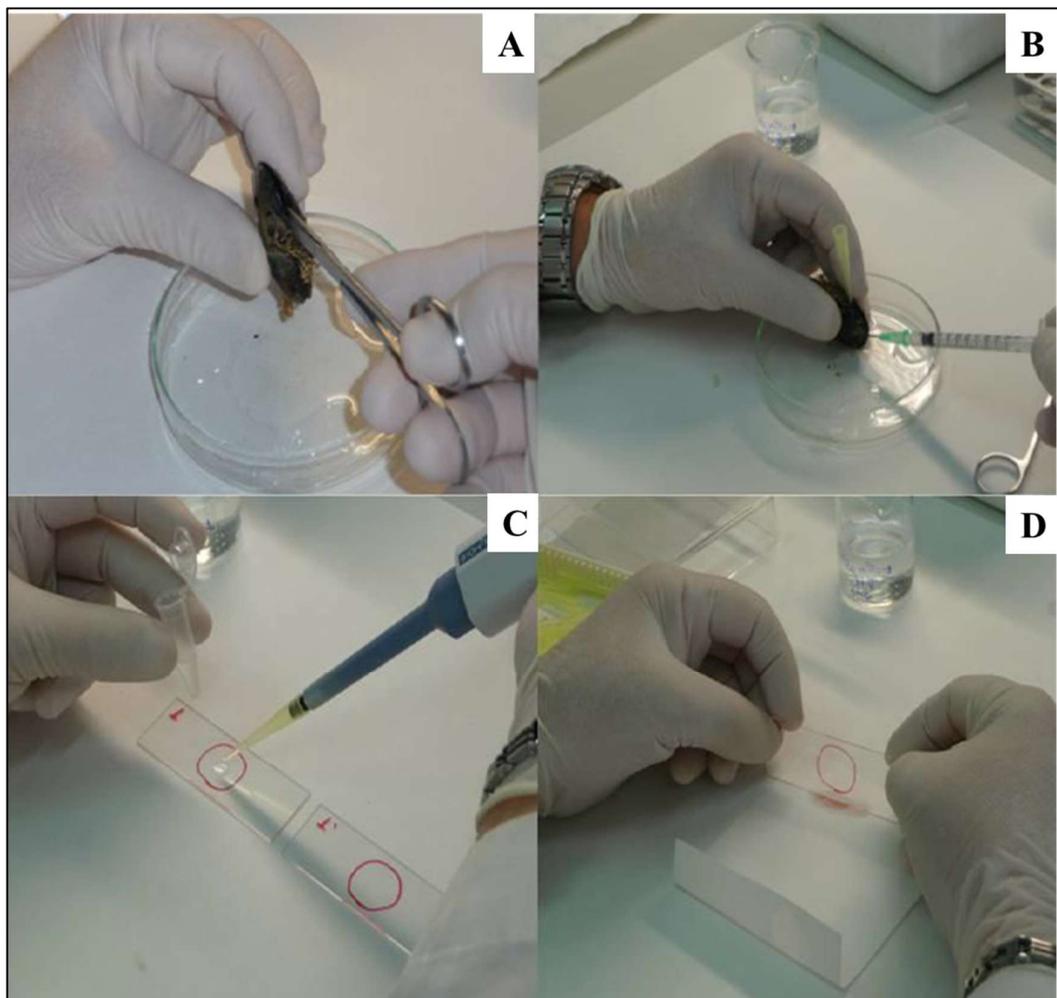
Uma alíquota de 0,5mL de hemolinfa do músculo adutor posterior de cada organismo foi coletada com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 2 mL, contendo 0,5mL de solução fisiológica, e acoplada à uma agulha padrão 21 (Figura 11). A seguir cerca de 40 µL desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) foi colocada em uma lâmina e exposto ao corante vermelho neutro previamente preparado. As lâminas foram sistematicamente examinadas em microscópio a cada 15 minutos para análise da quantidade de células com lisossomos danificados. O tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo “extravasamento” do conteúdo dos lisossomos para o citosol ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos e as células com lisossomos não danificados. O “end-point” foi determinado quando 50% ou mais das células exibiram anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol. O tempo de retenção médio para cada tratamento foi calculado pela média do tempo (minutos) dos animais analisados.

3.5 ANÁLISES QUÍMICAS

Foram realizadas duas análises diferentes para os dois grupos de contaminantes. As análises dos metais foram realizadas no Laboratório De Química Inorgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, supervisionado pelo Prof. Dr. Rubens Cesar Lopes Figueira. Enquanto os HPA foram analisados na mesma instituição pelo

Laboratório De Química Orgânica Marinha, supervisionado pela Prof. Dra. Márcia Caruso Bicego e Dra. Satie Taniguchi.

Figura 11. A. Com auxílio de uma tesoura, a concha é aberta. B. Utilizando uma seringa hipodérmica contendo 0,5mL de solução fisiológica é retirado 0,5mL de hemolinfa dos mexilhões. C. 40 μ L da mistura de hemolinfa e solução fisiológica é colocada sobre uma lâmina. D. Retira-se o excesso de solução da lâmina para posterior coloração.



Fonte: Martínez-Gómez *et al.*, 2015. (Adaptada)

3.5.1 Metais e Semimetal

A identificação e quantificação de sete metais (cádmio - Cd, cromo - Cr, cobre - Cu, ferro - Fe, níquel - Ni, chumbo - Pb e zinco - Zn) e um semimetal (arsênio - As) presentes nas diferentes matrizes (água e tecidos moles dos organismos) foram realizadas empregando técnicas de digestão ácida seguidas pela determinação por espectrometria de emissão óptica

com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (KIM *et al.*, 2016). Os 16 organismos de cada tratamento foram separados, secos em liofilizador e macerados, formando uma amostra composta para cada tratamento. Alíquotas de 0,35g de cada amostra foram decompostas em meio ácido utilizando 4 mL de ácido nítrico (HNO₃) e deixados em repouso por 8h. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂). Após 15h, as amostras foram colocadas em um bloco digestor em sistema fechado a 90°C, por 3h, até a digestão completa. Em seguida todas as amostras foram filtradas e diluídas com água Milli-Q até 35 mL para posterior análise (KIM *et al.*, 2016). As amostras de água foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL e armazenadas a -4°C até a análise no ICP-OES.

A análise por ICP OES consistiu em passar o extrato das amostras por um plasma de argônio durante o qual ocorreu a excitação dos elementos que emitem radiação específica, tornando possível sua identificação. A intensidade dos picos de emissão permite o cálculo da concentração de cada elemento.

3.5.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Foram analisados 18 HPA não alquilados (denominados HPA parentais) e 11 grupos de HPA alquilados de 5 compostos com alto potencial tóxico (C1, C2 e C3 naftalenos, C1 e C2 fluoreno, C1 e C2 fenantreno, C1 e C2 pireno e C1 e C2 criseno). A referência *C_n* está relacionada com o número de cadeias alquílicas na estrutura do HPA parental. Sendo assim, cada C1 naftaleno possui uma ligação de um grupo metila, cada C2 naftaleno possui dois grupos metila ligados na sua estrutura principal, e assim por diante.

Alíquotas de 1L de água de cada tratamento foram separadas para a extração dos HPA. Em cada amostra foram adicionados 40 mL de n-hexano e 100 µL dos padrões surrogados, que consistem em uma mistura de HPA deuterados (acenafteno-d10, fenantreno-d10, criseno-d12 e perileno-d12, em concentração de 500 ng mL⁻¹), exceto para o lixiviado puro no qual foi utilizado uma alíquota de 500 mL. Após agitação vigorosa por 2 minutos, o extrato orgânico foi separado da água utilizando um funil de separação de 2 L.

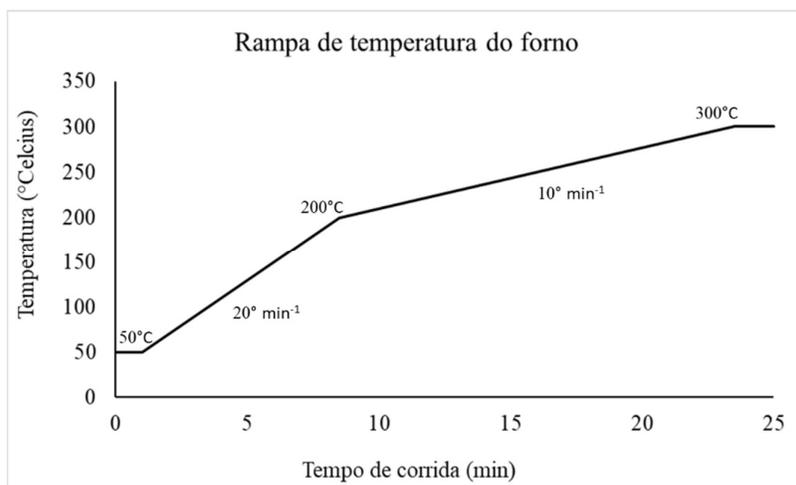
As análises de HPA no tecido seguiram a metodologia descrita em Chiovatto *et al.* (2021) com algumas adaptações. Alíquotas de aproximadamente 1 g de cada amostra composta (descrita acima) foram pesadas em cartuchos de extração e, sobre estas, foram adicionados 100 µL dos padrões surrogados (descritos acima). O sistema Soxhlet, contendo os cartuchos/amostras, foi montado com balões de 125 mL contendo 80 mL da solução de diclorometano:n-hexano (1:1, v:v). A extração no Soxhlet teve duração de seis horas. Em

seguida, os extratos foram concentrados em um concentrador automático utilizando gás N₂ até 1 mL e, na sequência, foram purificados, através do processo de cromatografia líquida em coluna de vidro (*clean-up*). Este procedimento consiste em preencher colunas de vidro (2 cm de diâmetro interno) com n-hexano, 8 g de sílica na base, 16 g de alumina no meio (ambas 5 % desativadas) e aproximadamente 1 cm de sulfato de sódio no topo. Após o extrato percolar a coluna, um volume de 80 mL de n-hexano foi eluído para a remoção dos HPA.

O volume de todos os extratos (amostras de água e de tecido) foram reduzidos no concentrador automático de maneira a obter um volume final de 1 mL. Em cada extrato foi adicionado 100 µL de um padrão de recuperação de HPA (terfenil – d14 em concentração de 500 ng mL⁻¹) para investigar a recuperação dos padrões surrogados adicionados no início do processo.

Para a identificação e quantificação dos analitos, os extratos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas sequencial (GC/MS/MS), ambos da Agilent Technologies (modelos 7890B e 7010B, respectivamente). Um µL do extrato foi injetado em modo splitless numa coluna capilar HP-5ms (Agilent J&W, GC Columns) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme interno. O gás de arraste foi o hélio com grau de pureza 5.0 e fluxo constante de 1 mL min⁻¹ na coluna capilar. Ambas as temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a 300 °C. Para a separação dos compostos, foi utilizada a programação de temperatura no forno conforme apresentado na Figura 12. A corrida completa para a análise de HPA totaliza 23,5 minutos.

Figura 12. Programação da temperatura do forno para separação de HPA.



Fonte: A autora (2024)

O triplo quadrupolo foi utilizado como analisador de massas e foram monitorados dois íons por analito (íon precursor e íon produto). O detector foi operado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos foi baseada no espectro de massas individual e nos tempos de retenção de cada analito obtidos em padrões certificados. A quantificação foi baseada no método de padronização interna, que considera a razão entre as áreas dos picos dos analitos de interesse e as áreas dos padrões surrogados. Esta razão é utilizada na equação da reta gerada em uma curva analítica previamente gerada para cada analito de interesse. Deste modo, de forma implícita, a correção do surrogado é aplicada no cálculo das concentrações dos analitos. O controle de qualidade destes procedimentos foi baseado no branco analítico (5 g de sulfato de sódio calcinado em vez de tecido orgânico), amostras em duplicatas, recuperação dos padrões surrogados e análises de material de referência adquiridos comercialmente para HPA (freeze-dried mussel tissue – adquirido da National Institute of Standards and Technology – *Mytilus edulis*: NIST-2974a).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados referentes ao comprimento dos organismos, índices de condição, tempos de retenção do corante vermelho neutro, concentrações dos metais e dos HPA foram previamente analisados pelo emprego de testes de normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilk e Levene respectivamente). Quando os pré-requisitos para análises paramétricas foram atendidos a comparação entre tratamentos foi realizada usando ANOVA unifatorial de teste de Tukey (comprimento e índices de condição) ou ANOVA two-way seguido do teste de Dunnett (tempo de retenção do corante vermelho neutro, metais e HPA). Alternativamente, o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *a posteriori* de Dunn foi usado quando os dados não se adequavam às premissas paramétricas. Todas as análises foram realizadas usando o software Statística 13.0 com nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizados 160 organismos adultos ao longo de todos os tratamentos e tempos de exposição. Durante o experimento morreram 3 organismos nas primeiras 24h, sendo um em cada um dos tratamentos: controle, 0,01% e 0,1%; 2 organismos morreram com menos de 48h

no tratamento 10%; e 1 morreu no terceiro dia de exposição (<72h) no tratamento 1%. Os demais organismos sobreviveram até o momento da coleta dos dados morfológicos. Os comprimentos variaram de 37,2 a 62,5 mm, as larguras foram de 13,3 a 33,5 mm e as alturas foram de 12 a 27,5 mm (Tabela 1). Os pesos totais variaram de 4,70 – 23,4 g e os pesos das conchas entre 1,66 e 8,97 g.

Tabela 1. Medidas morfométricas dos organismos utilizados durante o experimento de exposição.

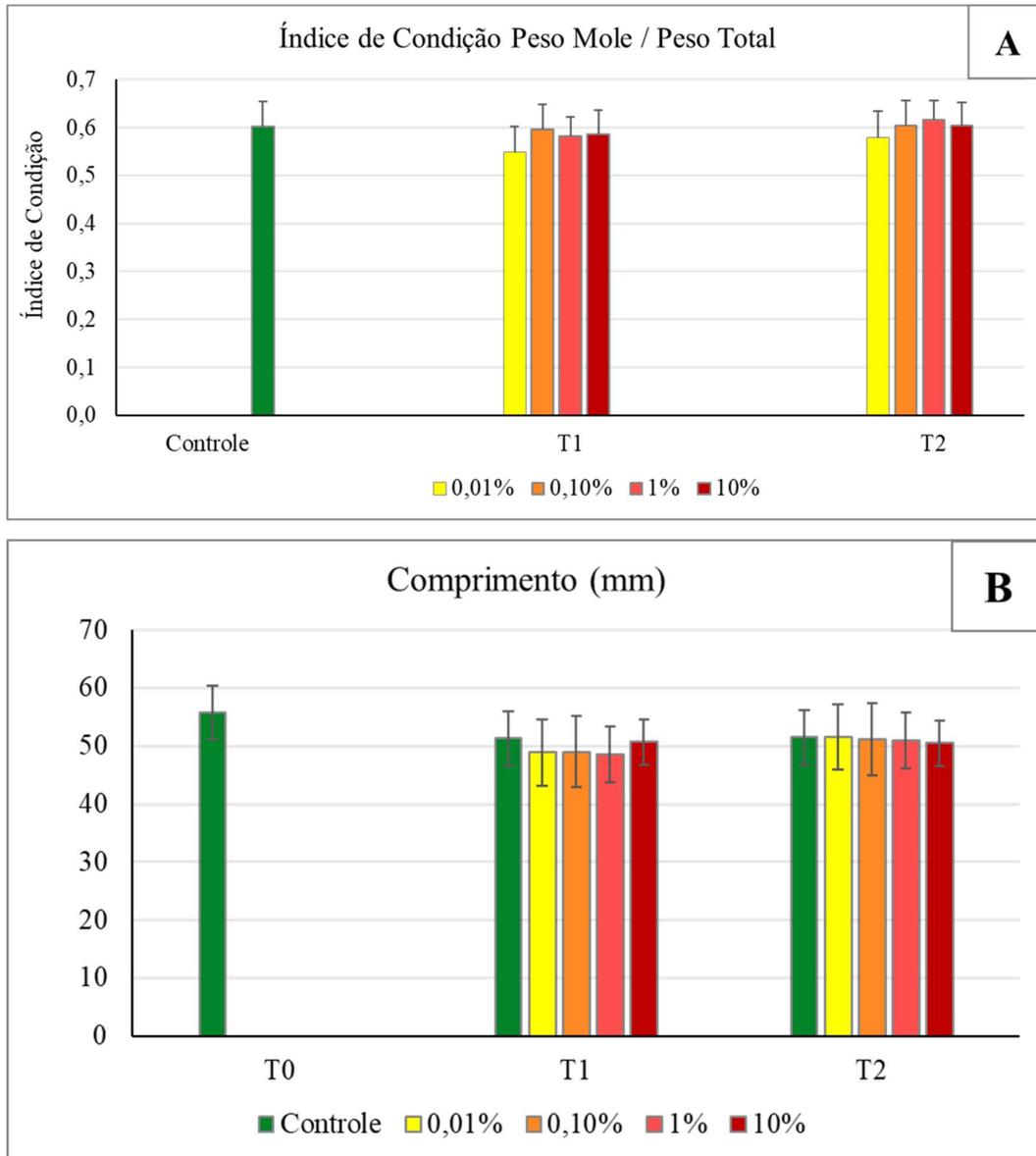
	Peso Total	Peso da Concha	Peso Mole	Altura	Largura	Comprimento
	g			mm		
Máximo	23,4	8,97	14,6	27,5	33,5	62,5
Mínimo	4,70	1,66	3,04	12,0	13,3	37,2
Mediana	11,3	4,66	6,59	18,4	25,6	51,0
Média	11,6	4,65	6,87	18,5	25,5	50,6
Desvio Padrão	3,56	1,38	2,35	2,22	3,04	5,24

Fonte: A autora (2024)

Com esses dados foi determinado o índice de condição (IC) (Figura 13.A), e foram analisadas as variações no comprimento dos organismos (Figura 13.B). O IC permite inferir se as condições fisiológicas dos organismos são diferentes, e o comprimento indica se o tamanho dos organismos influencia os resultados obtidos no teste de TRVN. Desta forma, é possível analisar se as diferenças observadas no tempo de retenção do vermelho neutro foram influenciadas pelas condições de saúde prévia dos organismos nos diferentes tratamentos realizados (ZENG; YANG, 2020).

Os resultados mostraram ausência de diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$ para ambos) indicando que os organismos possuíam a mesma condição fisiológica de saúde. Do ponto de vista experimental esses resultados indicam a ausência de divergências biológicas entre os tratamentos e que os efeitos observados são decorrentes do estresse causado pela exposição aos contaminantes. Ou seja, as diferenças entre os tratamentos e os tempos de exposição são reflexo das concentrações e dos efeitos dos contaminantes experimentalmente avaliados.

Figura 13. A. Índice de condição dos organismos utilizados nos experimentos de exposição. B. Comprimento dos organismos utilizados nos diferentes tratamentos do experimento de exposição.



Fonte: A autora (2024)

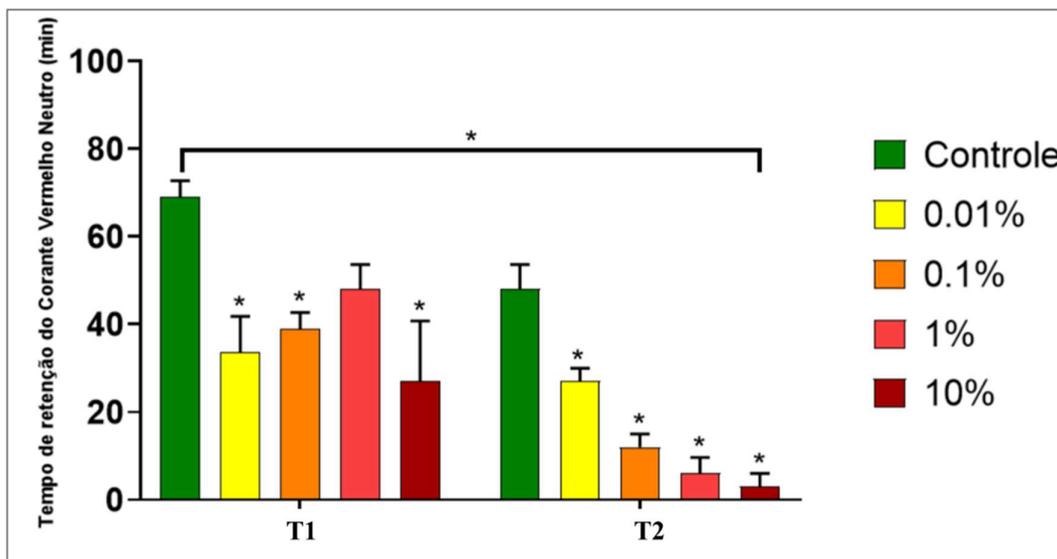
4. 1 ESTABILIDADE DA MEMBRANA LISOSSÔMICA

Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas no tempo de retenção do corante vermelho neutro (TRVN) em relação ao controle, exceto para a diluição de 1% no T₁ (Figura 14). Para todas as concentrações, as alterações foram significativamente diferentes

entre os tempos de exposição, mesmo considerando a menor concentração de lixiviado, indicando que o tempo de exposição é crucial para que os efeitos sejam intensificados.

Os organismos de ambientes tropicais apresentam menores tempos de retenção (TRVN > 60 minutos) do que os organismos de regiões temperadas (TRVN > 120 minutos) (ABESSA *et al.*, 2005; FRANCONI *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2007). Bivalves marinhos dos grupos controle podem apresentar respostas devido ao estresse imposto pelo teste, como observado para os organismos do grupo controle no T₂, que apresentaram tempos baixos, mesmo não apresentando diferenças significativas. Este resultado é, provavelmente, em função do estresse causado pelas variações de salinidade, temperatura ou intensidade de luz, para citar alguns fatores que poderiam levar a conclusões equivocadas da condição geral de saúde do organismo (PEREIRA *et al.*, 2011).

Figura 14. Tempo de retenção do corante vermelho neutro em organismos da espécie *Mytella charruana* expostos a lixiviados de bitucas de cigarro em dois tempos de exposição (24 e 120 h). Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação aos tempos de exposição 24h vs. 120h, assim como as diferenças dos diferentes tratamentos em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,0001$).



Fonte: A autora (2024)

Ostras expostas a uma série de diluições de lixiviados de BC (similares às do presente estudo) apresentaram diferenças significativas no TRVN somente a partir da diluição de 0,10

% (ROSA, 2023), sugerindo que os mexilhões possuem maior sensibilidade aos contaminantes presentes nos lixiviados. Mexilhões da espécie *M. galloprovincialis* foram expostos às concentrações de 0,5, 1 e 5 BCs L⁻¹ por 14 dias, e uma redução significativa na estabilidade da membrana lisossômica só foi observada na concentração de 5 BCs L⁻¹ (LUCIA *et al.*, 2023). Os resultados do presente estudo indicam danos significativos em concentrações muito menores (0,01%) e em tempos de exposição mais curtos (24 h e 120 h), indicando uma maior sensibilidade para a espécie *M. charruana*. Porém, a composição dos lixiviados pode variar de acordo com produção do tabaco, marca, formas de lixiviação e tal composição poderia estar afetando os organismos de formas distintas. Para serem feitas comparações mais representativas seria necessário expor os organismos de espécies diferentes à mesma solução de lixiviado.

A menor diluição do lixiviado presente na água (0,01%) representa aproximadamente 1 BC por 2.500 L de água; isto significa que, uma vez descartada incorretamente, uma bituca de cigarro tem o potencial para tornar impróprio 2.500 L de água e, conseqüentemente, causar efeitos sobre *M. charruana*. Este resultado é alarmante e representa mais do que o dobro do valor reportado anteriormente, que afirma que uma bituca pode contaminar aproximadamente 1.000 L de água com efeito tóxico para organismos vivos (GREEN *et al.*, 2014). Na praia de Boa Viagem/PE, uma praia urbana e um dos pontos turísticos mais populares do estado, foi calculada uma densidade de 8,85 BC m⁻² em um transecto de 1.125 m² (da SILVA *et al.*, 2023). Num evento de lixiviação pela subida das marés e utilizando os dados do presente estudo, é estimado que aproximadamente 25 milhões de litros de água sejam contaminados pelos resíduos das bitucas descartadas irregularmente. Porém, é importante ressaltar que as densidades de BC não são uniformes ao longo de toda extensão da praia; essa distribuição é dependente do uso, nível de urbanidade das praias, assim como da sazonalidade (da SILVA *et al.*, 2023; DÍAZ-MENDOZA *et al.*, 2023; RIBEIRO *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que este cálculo não leva em consideração o poder de dispersão da zona costeira e assume que o processo de lixiviação ocorrerá como o realizado no laboratório, se caracterizando como uma estimativa aproximada.

4.2 ANÁLISE QUÍMICA DO LIXIVIADO

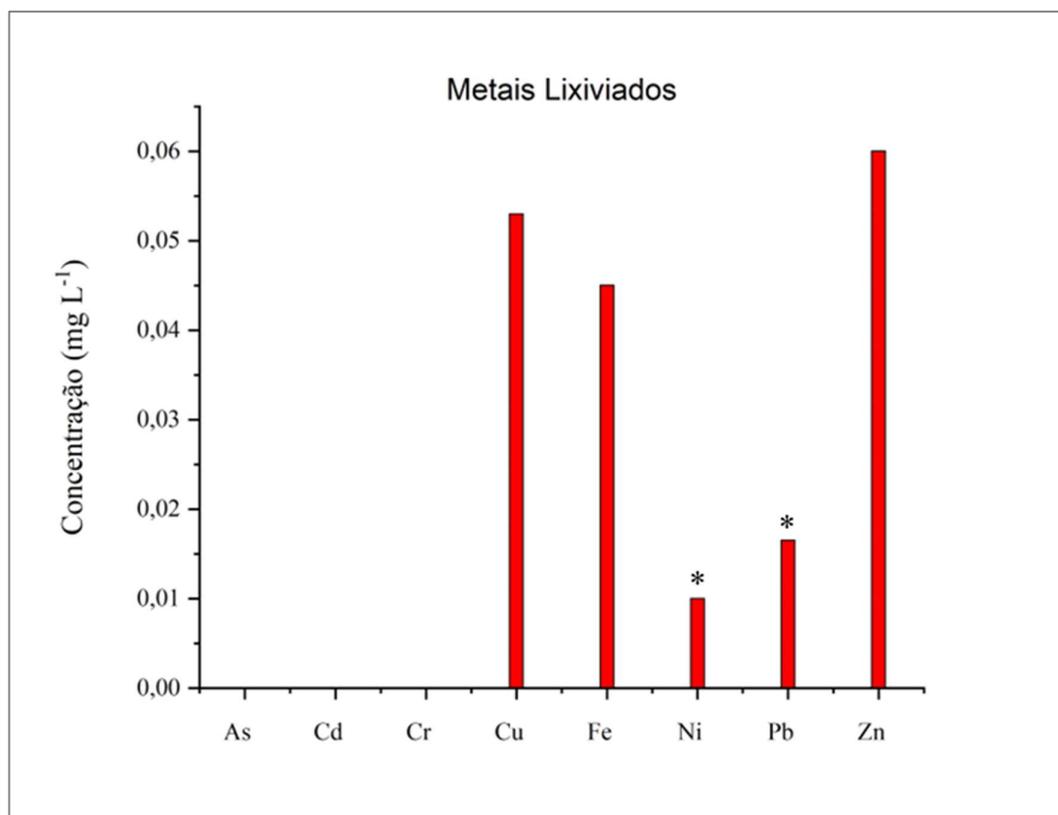
No lixiviado bruto foram detectados apenas os elementos Cu, Fe, e Zn com concentrações de 0,053, 0,045 e 0,060 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela S1, Figura 15). Os

demais elementos (As, Cd, Cr, Ni e Pb; 4 entre os 7 analisados) não foram detectados ou apresentaram concentrações abaixo de seus respectivos limites de quantificação (LQs). Concentrações de Cu e Zn (0,036 e 0,079 mg L⁻¹, respectivamente) para lixiviados da marca de cigarros Winston-silver foram similares às reportadas por este estudo, porém a concentração do Fe foi uma ordem de grandeza maior com 0,758 mg L⁻¹ (SOLEIMANI *et al.*, 2022a). Não foi detectado arsênio no lixiviado do presente estudo, porém lixiviados preparados com uma quantidade maior de bitucas de cigarros por litro (em média, >10 BCs L⁻¹) apresentaram concentrações de 32,8 a 59 µg L⁻¹ (MANSOURI *et al.*, 2022). Uma comparação feita com cinco marcas diferentes de cigarro encontrou que a marca Winston possui em média as menores concentrações de As lixiviados (MANSOURI *et al.*, 2022). A variação desses elementos pode estar relacionada com o cultivo do tabaco, pois são dependentes do tipo de solo e dos fertilizantes utilizados, considerando que esses fatores podem alterar os níveis de metais na planta de tabaco (DAI *et al.*, 2021; LISUMA *et al.*, 2021; ROSELLI *et al.*, 2021). Cerca de 58 a 150 kg de metais são introduzidos anualmente no meio ambiente provenientes da lixiviação de bitucas de cigarro, baseando-se na concentração de 43 µg L⁻¹ por BC e em valores aproximados de 165 bilhões de cigarros consumidos por ano (90% descartados irregularmente) (FARZADKIA *et al.*, 2022). O tabaco é uma das culturas que mais exigem pesticidas, sendo associado ao uso de pelo menos 50 tipos diferentes, que podem ser potenciais fontes de metais para a planta (BAILEY *et al.*, 2013; DÁVILA *et al.*, 2020; SOLEIMANI *et al.*, 2022a).

A concentração total de HPA no lixiviado foi 2.149 ng L⁻¹, com os compostos de baixo peso molecular (*low molecular weight* – LMW) perfazendo aproximadamente 98% do total (Figura 16). O naftaleno e seus homólogos alquilados foram os predominantes, variando entre 61,0 e 1.488 ng L⁻¹, resultando numa concentração total deste grupo de 2.007 ng L⁻¹ (aprox. 90%). Tais compostos, em geral, possuem maior solubilidade que os de alto peso molecular (*high molecular weight* - HMW; 4 a 6 anéis) e tendem a se concentrar em água, refletindo nas maiores concentrações relativas observadas nas amostras (SOLEIMANI *et al.*, 2022a). Concentrações similares de naftaleno foram reportadas para lixiviados provenientes de BC queimadas (filtro queimado, resíduo de tabaco não queimado e cinza), BC não queimadas e filtros de BC (FBCs - SOLEIMANI *et al.*, 2022b), sugerindo que estes compostos já estão presentes no cigarro antes da queima. Entre estas três matrizes, as BCs apresentaram as maiores concentrações de ΣHPA, seguido dos FBCs (SOLEIMANI *et al.*, 2022b). Em oposição ao presente estudo, os demais HPA apresentaram valores mais elevados. O fenantreno foi o segundo HPA mais abundante, com uma concentração de 49,9 ng L⁻¹. A predominância deste

HPA e do naftaleno e seus alquilados também foi reportada por Dobaradaran *et al* e Soleimani *et al* (2019; 2020; 2022b). Entre os HPA de HMW, o benzo[a]pireno foi o mais abundante com $12,2 \text{ ng L}^{-1}$, porém o fluoranteno, pireno, C1–pireno e benzo[a]antraceno também apresentaram concentrações acima do limite de quantificação ($2,5 \text{ ng L}^{-1}$). Compostos como o benzo[a]pireno e benzo[a]antraceno apresentaram maiores concentrações em BC do que outras matrizes e componentes do cigarro, como a fumaça ou o lixiviado, provavelmente decorrente da sua baixa tendência de volatilizar ou solubilizar, o que pode explicar sua baixa concentração no lixiviado (SOLEIMANI *et al.*, 2022a). Esta informação é muito relevante, pois indica que a composição química do lixiviado não necessariamente reflete as reais proporções desses HPA presentes na BC.

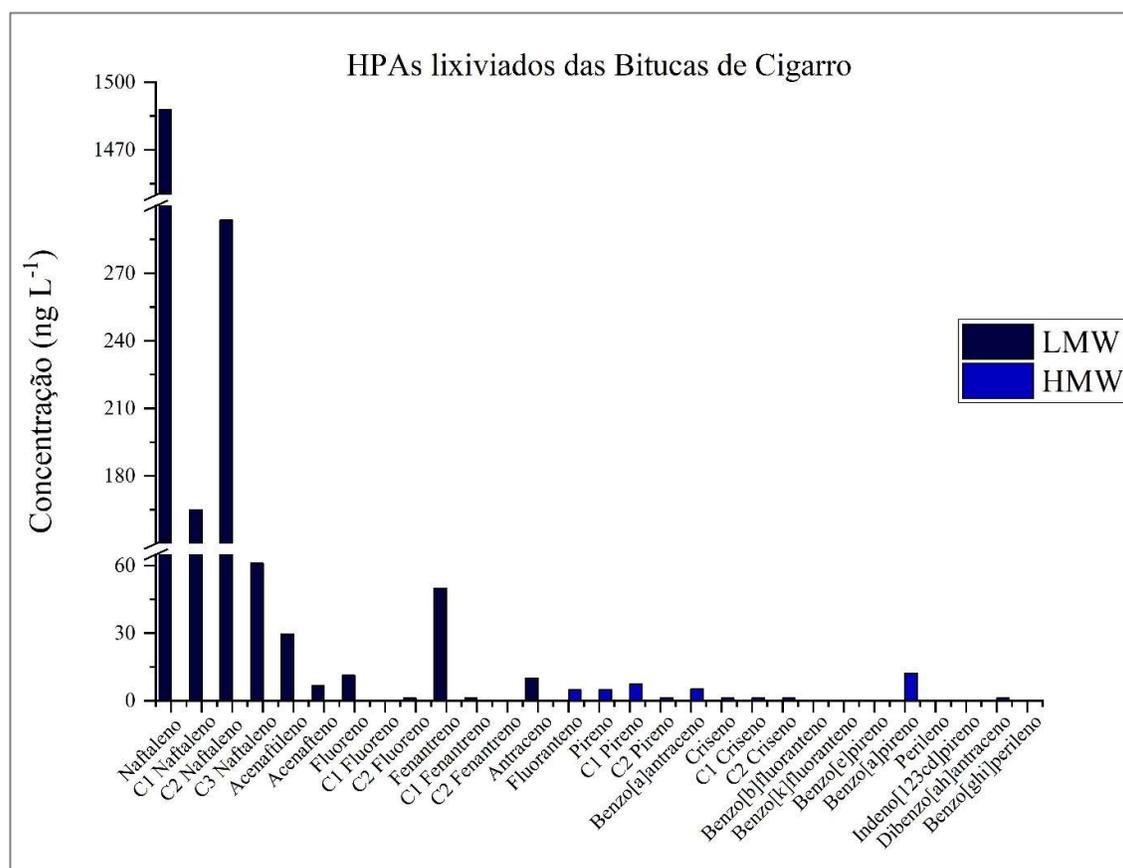
Figura 14. Concentração de metais lixiviados das bitucas de cigarro. (*) elementos que apresentaram concentrações abaixo dos seus respectivos limites de quantificação.



Fonte: A autora (2024)

É conhecido que o óleo bruto é uma fonte significativa de HPA para o ambiente e que a presença de óleo resulta em diversos impactos adversos a biota. As concentrações observadas no lixiviado causaram preocupação pois foram da mesma ordem de magnitude de uma amostra de fração solúvel do óleo bruto em água do mar (FSA): aproximadamente 2.315 ng L⁻¹ (MÜLLER *et al.*, 2021). Os autores obtiveram estas concentrações a partir de 9 g de óleo bruto em 3 L de solução aquosa e cabe ressaltar que a distribuição relativa entre os HPA foi similar ao do presente estudo, com os compostos de LMW predominando em relação aos de HMW. Essas concentrações causaram a redução do crescimento e modificação na morfologia de células das zooxantelas (MÜLLER *et al.*, 2021).

Figura 15. Concentrações de HPA lixiviados de bitucas de cigarro.



Fonte: A autora (2024)

O processo de lixiviação é influenciado por parâmetros abióticos, sofrendo variação em decorrência do pH, salinidade e tempo de permanência na água; valores de pH mais ácido e

salinidades baixas apresentam maior capacidade de lixiviação para diversos contaminantes, incluindo metais, nicotina e nitrosaminas, do que águas alcalinas e salgadas, como a água do mar (AKHBARIZADEN *et al.*, 2021; ROSELLI *et al.*, 2021). Apesar disso, a lixiviação de metais em águas salgadas ocorre principalmente nas primeiras 24h de contato com a água, enquanto em água doce essa dessorção é mais lenta e sua máxima ocorre com mais de um mês após o contato inicial (AKHBARIZADEN *et al.*, 2021). Em oposição, os compostos orgânicos de LMW são lixiviados principalmente nas primeiras horas da exposição das bitucas à água doce, atingindo um máximo nas primeiras semanas, enquanto os compostos de HMW apenas começam a ser lixiviados a partir de 20 dias de contato com a água (DOBARADARAN *et al.*, 2020). Estes resultados evidenciam a importância do tempo de residência (ou tempo de permanência) da BC num ambiente aquático. Em sua composição química, as águas marinhas apresentam, além dos diferentes sais, material particulado em suspensão e matéria orgânica, que pode resultar na formação de complexos e substâncias insolúveis com os contaminantes presentes nas BCs, removendo esses metais e outros contaminantes da coluna d'água e possivelmente diminuindo sua biodisponibilidade (KOUTELA *et al.*, 2020; MOERMAN; POTTS, 2011).

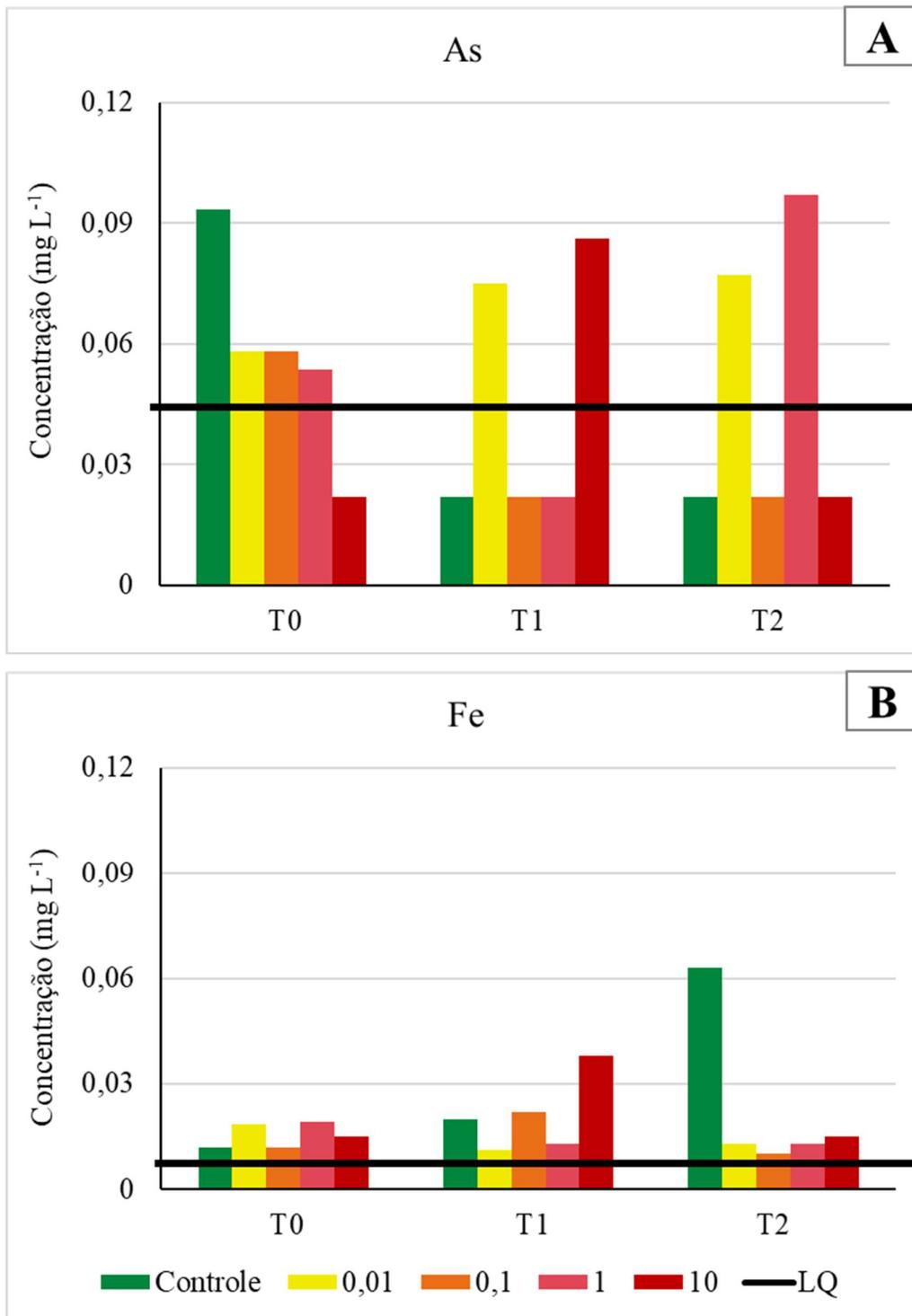
Outra característica importante das bitucas é a fluotabilidade. A princípio as BC flutuam na coluna d'água, podendo ser carregadas por longas distâncias em rios ou correntes marinhas para lugares com parâmetros físico-químicos distintos do local onde foram originalmente descartadas (ENGLER, 2012). Sua fluotabilidade está relacionada com a hidrodinâmica local. Sob agitação, as BC apresentam menor tempo de residência na coluna d'água e se depositam, fato que leva em média 7 dias para ocorrer (com um máximo de 18,5 dias em experimentos laboratoriais) (LIMA *et al.*, 2021). Em geral, uma hidrodinâmica alta tende a diminuir a deposição dos materiais em suspensão. Porém, por se tratar de resíduos porosos, esta hidrodinâmica irá favorecer o preenchimento dos espaços intersticiais das BCs pela água. O presente estudo utilizou água com salinidade 26 e um tempo de lixiviação de 24h. Desta forma, espera-se ter atingido o período de dessorção máxima dos metais em águas salgadas/salobras e boa parte dos compostos orgânicos de LMW. O lixiviado também foi mantido em constante agitação, simulando uma alta hidrodinâmica, tanto com objetivo de diminuir a fluotabilidade quanto para acelerar o processo de lixiviação. Desta forma, em um cenário ambiental, os compostos lixiviados de BCs podem induzir efeitos deletérios em diferentes organismos a depender dos seus hábitos de vida (de SOUZA ABESSA *et al.*, 2021; GREEN *et al.*, 2022; LUCIA *et al.*, 2023; MANSOURI *et al.*, 2020). Isso ocorre pois, logo que atinge a coluna

d'água, os compostos mais hidrofílicos são lixiviados, causando efeitos em organismos pelágicos. Posteriormente, na medida em que se depositam no assoalho, com o aumento do tempo de lixiviação, os compostos mais hidrofóbicos particionam para o sedimento e/ou biota, atingindo outra variedade de organismos (NETTO *et al.*, 2000; MEIRE *et al.*, 2007).

4.3 ANÁLISE QUÍMICA DOS MEIOS EXPOSIÇÃO

Apenas o As e o Fe foram passíveis de quantificação nas amostras de água obtidas durante os experimentos, com concentrações $0,0747 \pm 0,016$ e $0,0149 \pm 0,004$ mg L⁻¹, respectivamente (Tabelas S2 e S3). O As foi detectado em todos os tratamentos, com pequenas variações (< 21%) entre os diferentes tratamentos e tempos de exposição (Figura 17.A). Como não foi encontrado no lixiviado, conclui-se que o As presente nestas soluções tem origem na água controle utilizada no preparo das diluições. O Fe também foi encontrado em todas as diluições, o que era esperado, pois foi encontrado tanto na água controle como no próprio lixiviado (Figura 17.B). Da mesma forma que para o As, as variações entre os diversos tratamentos foram pequenas (< 20%), oscilando entre 0,010 e 0,028 mg L⁻¹. Estas variações estão dentro do erro analítico da metodologia empregada (coeficiente de variação < 20%), considerando as diluições realizadas para os tratamentos. Cu e Zn apresentaram concentrações de 0,053 e 0,060 no lixiviado, porém, uma vez diluído, os valores ficaram abaixo do LQ.

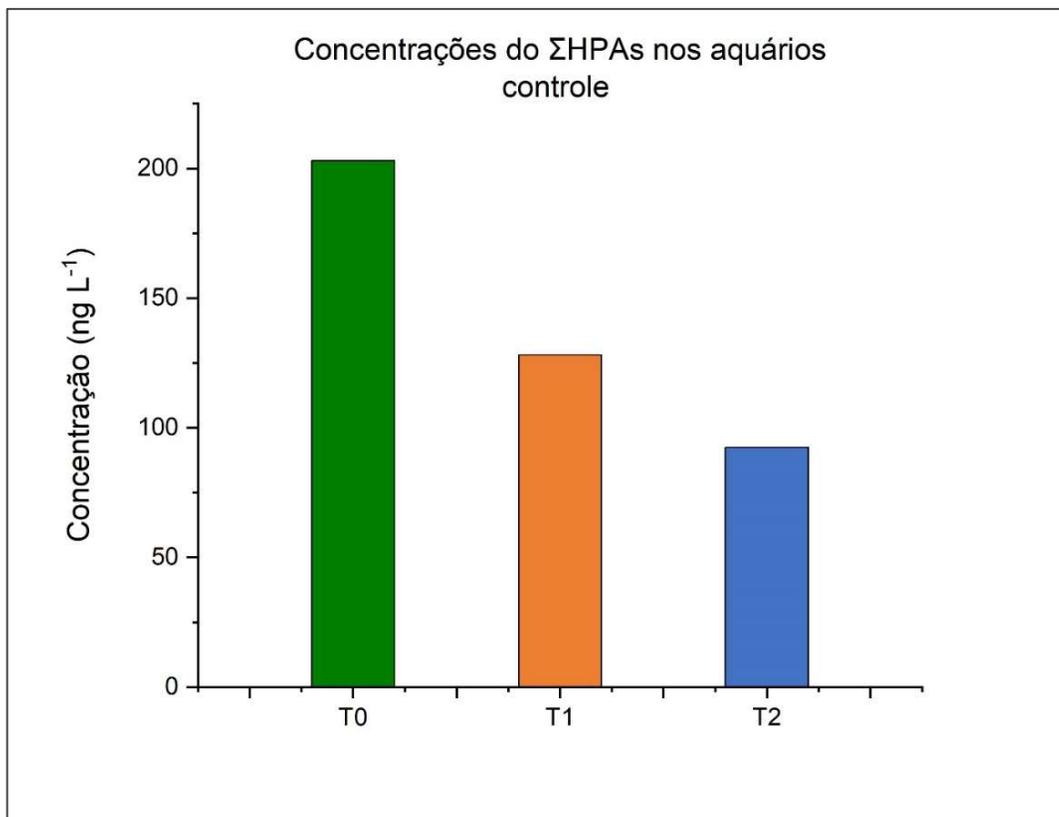
Figura 16. A. Concentrações de As nos aquários de exposição em ambos os experimentos; B. Concentrações de Fe nos aquários de exposição em ambos os experimentos.



Fonte: A autora (2024)

No T_0 , a água utilizada para os aquários controles dos diversos experimentos apresentaram concentração média de Σ HPA de $205 \pm 2,93 \text{ ng L}^{-1}$, também prevalecendo os compostos de LMW, que representaram mais de 95%. Assim como no lixiviado, o composto mais abundante foi o naftaleno (114 ng L^{-1}), seguido do fenantreno ($43,1 \text{ ng L}^{-1}$). Os demais compostos de HMW apresentaram concentrações $< 2,5 \text{ ng L}^{-1}$. Ao final do 1º experimento (após 24h) o aquário controle apresentou variação de aproximadamente -40% (128 ng L^{-1}) e após 120h, a concentração foi $92,4 \text{ ng L}^{-1}$, o que representa uma diminuição de 55% (Figura 18). Estes resultados sugerem que os HPA estão sendo removidos da coluna d'água – seja por processos de evaporação, degradação, acumulação nos organismos ou perda por aderência nas paredes do aquário.

Figura 17. Concentrações do somatório de HPA na água dos aquários controle nos três tempos de exposição ($T_0 - 0\text{h}$; $T_1 - 24\text{h}$; $T_2 - 120\text{h}$).

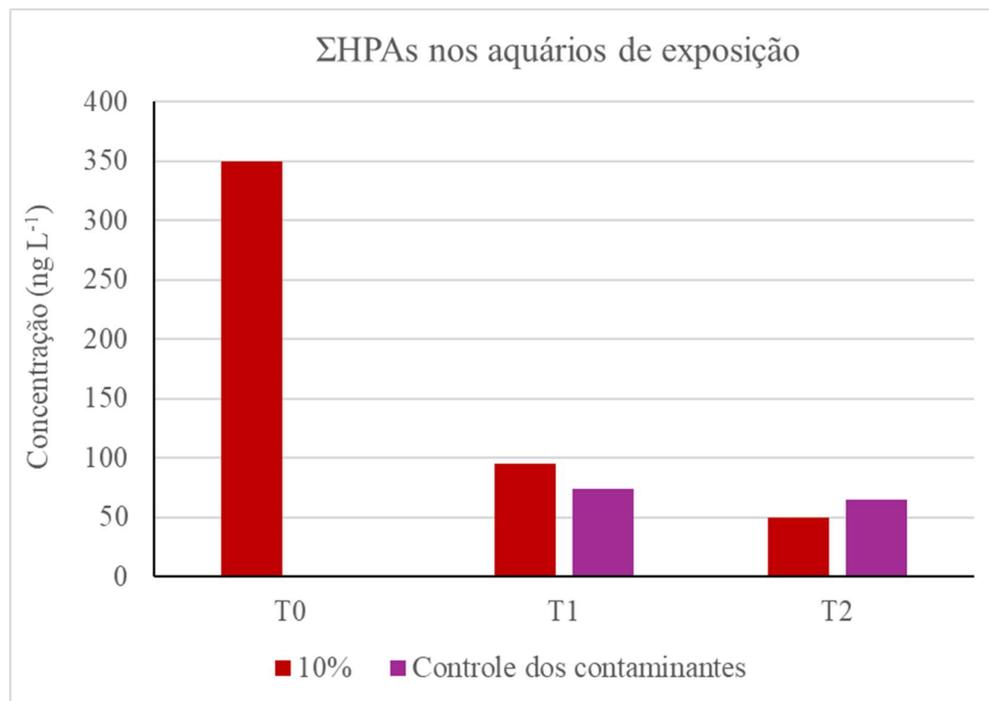


Fonte: A autora (2024)

A concentração dos HPA foi determinada a água dos aquários com 10% de lixiviado, considerando a presença e ausência de organismos. Os resultados apresentaram uma diferença

percentual relativa de ~25% (Figura 19), o que é aceitável como variação da metodologia utilizada, indicando que as concentrações são similares. Esta informação também sugere que, se houve transferência para os organismos, as concentrações foram relativamente baixas estando dentro da variação do método. Em relação ao início dos experimentos houve uma redução da concentração em 76% nas primeiras 24h e em 84% ao final de 120h. Isto sugere que não houve fontes de contaminação externas e, em contrapartida, existem outros processos de remoção dos HPA ocorrendo simultaneamente à possível acumulação pelos organismos, tais como aderência às paredes do aquário, fotodegradação e/ou ação microbiológica.

Figura 18. Concentrações de HPA na água dos aquários considerando as soluções preparadas com 10% do lixiviado.



Fonte: A autora (2024)

4.4. ANÁLISE QUÍMICA DOS ORGANISMOS

As concentrações de metais nos organismos variaram de não detectado (nd) a 253 mg kg⁻¹ (Fe, controle do T₁) (Tabela 2). O Pb não foi detectado em nenhuma das amostras, enquanto Cd, Cr e Ni apresentaram concentrações <LQ. Os demais elementos foram separados em 3 grupos com concentrações de ordens de grandeza similares: As e Cu < 10 mg kg⁻¹; 40 mg kg⁻¹

< Zn <60 mg kg⁻¹; e Fe com concentração > 100 mg kg⁻¹. O Fe apresentou a maior concentração em todas as amostras seguido do Zn e As. Não foram observadas variações significativas entre os tratamentos e nem entre os tempos de exposição, indicando que os organismos mantiveram suas concentrações de elementos-traço originais. Este resultado já era esperado uma vez que as soluções de exposição não continham estes metais e, no caso do Fe, a concentração inicial nos organismos era cerca de 4 ordens de grandeza maior do que na água, sugerindo que, se algum acúmulo ocorreu, foi imperceptível frente à concentração inicial. Recentemente, mexilhões coletados na mesma região do presente estudo, durante os períodos verão e inverno, apresentaram concentrações de metais maiores que aquelas reportadas aqui em ambas as estações do ano, exceto para As (7,0 ± 4,4 mg kg⁻¹) durante o verão, que apresentou concentrações similares (TREVIZANI *et al.*, 2023). Estes dados reforçam a hipótese que os organismos foram previamente contaminados no ambiente e as concentrações não são decorrentes da bioacumulação após a exposição aos lixiviados.

Dentre os 29 HPA analisados nos organismos, antes do experimento, apenas o fenantreno foi detectado com uma concentração de 3,75 ng g⁻¹. Ao final dos experimentos o mesmo resultado se repetiu para os organismos dos aquários controle, resultando numa média de 3,84 ± 0,32 ng g⁻¹. Este resultado é interessante do ponto de vista analítico e demonstra que os organismos não acumularam HPA ao longo dos experimentos, ainda que a água utilizada para exposição (diluição e controle) tenha apresentado níveis mensuráveis de vários HPA. Nos organismos expostos aos diferentes tratamentos, também foram detectados apenas o naftaleno e o fenantreno (Tabela 3). Os organismos expostos às maiores concentrações de lixiviados (10%) apresentaram concentrações significativamente maiores do que os organismos no T₀ (> 200%), em ambos os experimentos.

As concentrações observadas nos organismos de cada tratamento foram subtraídas das concentrações encontradas nos organismos do controle, com o objetivo de calcular o acúmulo referente aos HPA presentes nas diferentes soluções de exposição (Tabela 3, Figura 20). É possível observar que os organismos do T₂, em todos os tratamentos, apresentaram concentrações maiores de ΣHPA em relação ao T₁, com exceção do tratamento 10%, corroborando a hipótese de que o tempo de exposição é fator fundamental para o processo de bioacumulação nos mexilhões (YANCHEVA *et al.*, 2018.) Entretanto, considerando-se a variação aceitável própria da metodologia (20 %), observa-se que não há diferença entre os resultados obtidos entre os três tratamentos: 10% do T₁ e 1 e 10 % no T₂, sugerindo que, para concentrações maiores do lixiviado (10%), a acumulação atinge seu ponto máximo já em 24 h.

Um estudo recente realizado com ostras apresentou dados contraditórios no qual o tempo de exposição (24h – 96h) não influenciou significativamente a bioacumulação das ostras (ROSA, 2023). Esses resultados são intrigantes considerando que ambos os organismos ocupam o mesmo nível na teia trófica. Isto reflete as diferenças inatas de cada espécie a estímulos similares, tais como capacidade de depuração, limite de acumulação e alimentação (PEREIRA *et al.*, 2011; SZCZYBELSKI *et al.*, 2019).

Tabela 2. Concentração de metais no músculo dos organismos.

Label	T ₀	T ₁					T ₂				
		Controle	0,01	0,1	1	10	Controle	0,01	0,1	1	10
mg/kg											
As	7,77	7,45	6,11	7,44	7,41	8,23	8,46	6,93	6,09	9,39	6,78
Cd	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*	<0,848*
Cr	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*	<1,01*
Cu	6,24	6,52	6,06	6,26	6,13	6,88	7,23	6,29	6,61	7,57	6,58
Fe	201	253	172	199	210	165	207	145	172	175	211
Ni	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*	<1,99*
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn	54	54,6	51,7	55,6	51,6	52,3	51,5	46,7	49	55,5	52,7

* – Limite de quantificação de cada analito;
 ND = não detectado.

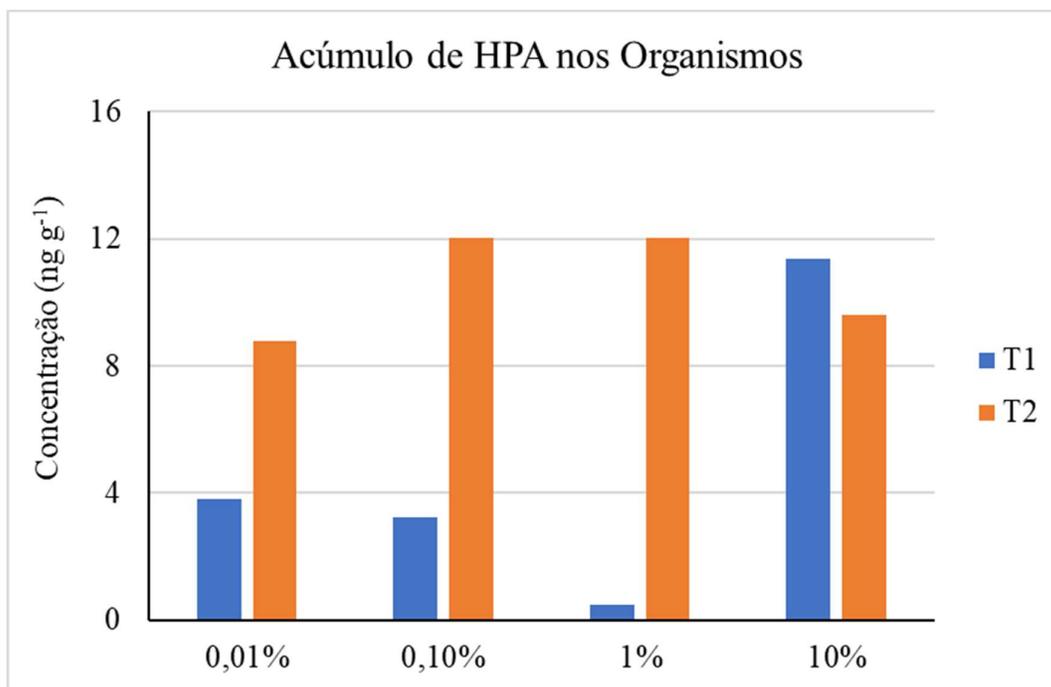
Fonte: A autora (2024)

Tabela 3. Concentrações acumuladas do naftaleno e fenantreno no músculo dos organismos.

Composto	T ₁				T ₂			
	0,01%	0,10%	1%	10%	0,01%	0,10%	1%	10%
	ng g ⁻¹							
Naftaleno	4,58	3,64	0	11,5	4,58	4,32	6,86	4,63
Fenantreno	0	0	0,48	0	4,20	7,71	5,18	4,95
Total	4,58	3,64	0,48	11,5	8,78	12,0	12,0	9,58

Fonte: A autora (2024)

Figura 19. Concentração de HPA acumulados nos organismos.



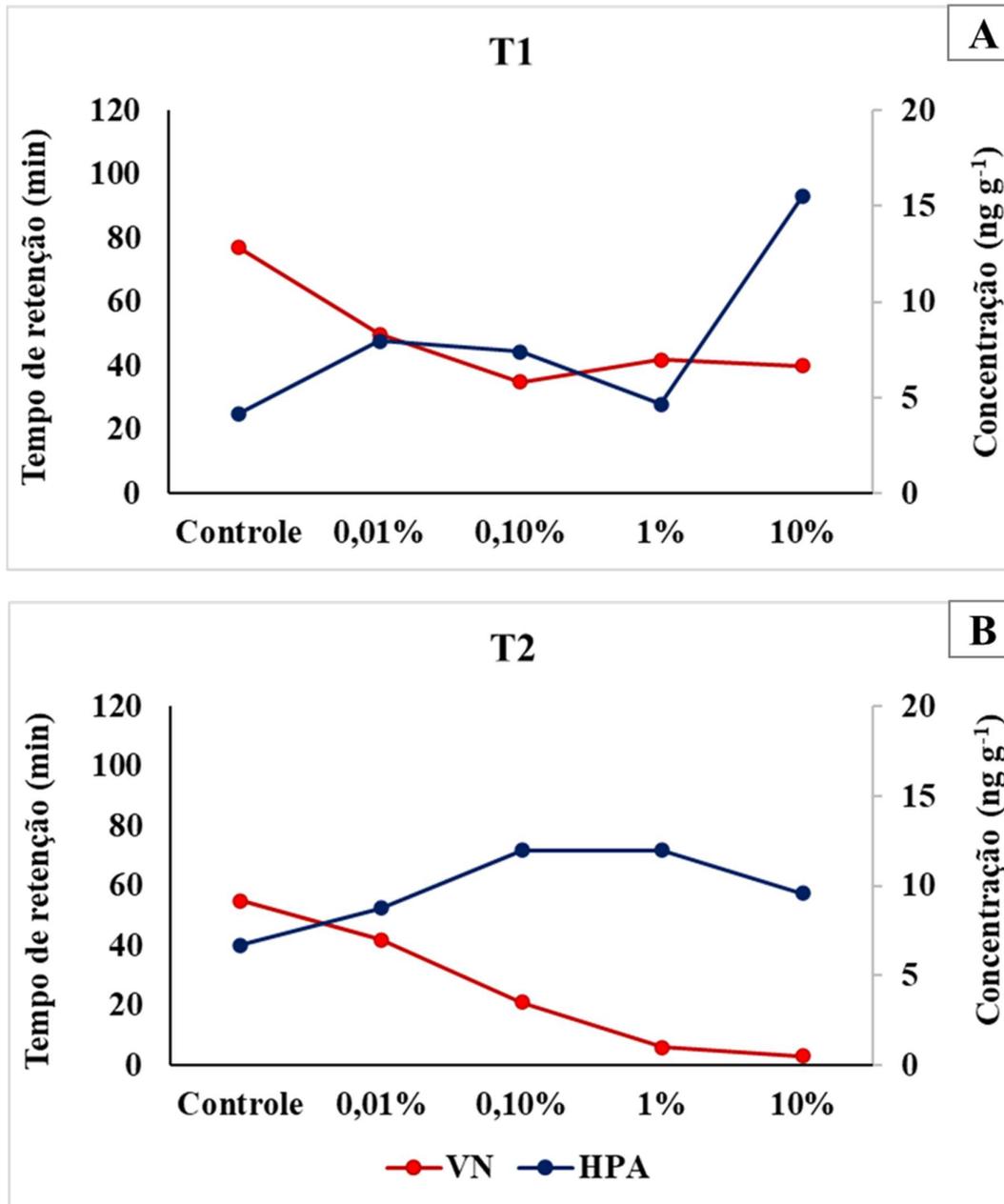
Fonte: A autora (2024)

Outro fator importante a ser realçado é a porcentagem da massa de HPA acumulada (%MA) pelos organismos em relação a massa a qual eles foram expostos. Para calcular a MA, foi multiplicada a concentração de ΣHPA encontrada nos organismos pela massa total pesada de organismos expostos em cada tratamento. A massa de exposição foi calculada através da concentração de cada tratamento vezes o volume de água nos aquários (20L). As %MAs foram entre 0,1 e 10%, exceto na diluição 10% do T₁, que apresentou uma alta taxa de acumulação

equivalente a 20%. Os resultados mostram que a %MA é irrelevante em comparação ao decréscimo das concentrações de HPA ocasionado por outros fatores além da bioacumulação (média 9,2% vs 79% descritos acima). Isto corrobora a hipótese que os outros processos predominam na remoção dos HPA da coluna d'água.

As concentrações de HPA acumuladas nos organismos apresentaram uma correlação inversa com os dados do TRVN, nos diferentes tratamentos para cada tempo de exposição (Figura 21). Este resultado é corroborado por um estudo que analisou TRVN em mexilhões transplantados de áreas com extrema poluição por HPA (FRANCIONI *et al.*, 2007). Os organismos desse experimento expostos ao tratamento 1% apresentaram concentrações de HPA menores do que as diluições 0,01 e 0,1%. Embora não seja possível determinar o motivo desta menor acumulação, este resultado foi refletido nas respostas do TRVN, onde se observou um aumento no tempo de retenção do corante, sugerindo que possivelmente pode ter ocorrido alguma alteração no preparo das soluções de exposição. Da mesma forma, no segundo experimento (maior tempo de exposição), foi observado uma relação inversa entre acúmulo de HPA e resposta do TRVN. O valor mais baixo de concentração acumulada observada no tratamento de 10% está dentro da variação aceita do erro analítico do método (20%) e, portanto, as concentrações reportadas para os tratamentos de 1 e 10% são, estatisticamente, similares. Corroborando nossos resultados, experimento com mexilhões-zebra (*Dreissena polymorpha*), de água doce, expostos a HPA por 96 horas e 31 dias (concentrações entre 1 - 3 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram danos às membranas lisossômicas (YANCHEVA *et al.*, 2018).

Figura 20.A. Relação da concentração de ΣHPA nos organismos e o tempo de retenção do corante vermelho neutro no experimento de 24 h (T₁); B. Relação da concentração de ΣHPA nos organismos e o tempo de retenção do corante vermelho neutro no experimento de 120h (T₂).



Fonte: A autora (2024)

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas de membrana única envolvidos na degradação do material absorvido pela célula por endocitose, mas o mais importante é que são capazes de acumular um amplo número de diferentes classes de contaminantes químicos (JOHANSSON *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-GÓMES *et al.*, 2015). Eles são extremamente sensíveis a concentrações mínimas de produtos químicos tóxicos que penetram nas células e a mudança de estabilidade foi relatada como extremamente rápida em mexilhões expostos até mesmo a concentrações de contaminantes orgânicos e inorgânicos na ordem de nmol L^{-1} (MARTÍNEZ-GÓMES *et al.*, 2015). O ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro é uma metodologia bastante eficiente, confiável e sensível para a análise da saúde geral dos organismos e já foi empregada na exposição de diversos contaminantes como HPA, metais e outros compostos químicos presentes em lixiviados de BC (CORTEZ *et al.*, 2018; ISTOMINA *et al.*, 2020; MARTÍNEZ-GÓMES *et al.*, 2015; OKAY; KARACIK, 2008; YANCHEVA *et al.*, 2018). Uma comparação utilizando o TRVN e a taxa de filtração da água de mexilhões mediterrâneos (*Mytilus galloprovincialis*) expostos a diferentes HPA concluiu que o TRVN é uma ferramenta mais sensível para análise da contaminação por HPA utilizando concentrações que variaram de 1 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (OKAY; KARACIK, 2008). O TRVN é uma metodologia tão estabelecida que vem sendo incluída em programas de monitoramento por organizações como o Conselho Internacional para Exploração do Mar (ICES – *International Council for Exploration of the Sea*), comissões de Oslo e Paris (OSPAR) e a Convenção de Barcelona (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2008). O ensaio de retenção do corante vermelho neutro é considerado uma ferramenta confiável para avaliar a estabilidade da membrana lisossômica que representa um biomarcador de estresse geral, bem como um indicador prognóstico para possíveis patologias e, como tal, é um indicador fisiopatológico do estado de saúde do mexilhão.

Os lisossomos são as organelas degradativas, agindo em vias endocítica, fagocítica e autofágica (MARTÍNEZ-GÓMES *et al.*, 2015). A integridade das membranas lisossomais são essenciais para muitos processos celulares, desde a manutenção da homeostase celular até o controle de qualidade e reciclagem de macromoléculas e organelas. Esse funcionamento também está associado às membranas lisossômicas por serem altamente suscetíveis a efeitos oxidativos de espécies reativas de oxigênio (JOHANSSON *et al.*, 2010). A perda da estabilidade dessa membrana, resultante da exposição a contaminantes como, por exemplo, lixiviados de BC, pode afetar a resposta imunológica, a nutrição e a reprodução desses organismos (AVIO *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2022). Porém, os danos à estabilidade da

membrana lisossômica não se restringem apenas ao organismo: essas alterações já foram correlacionadas com a produção de gametas e desenvolvimento larval, que levariam a alterações populacionais, possivelmente impactando toda a teia trófica (MOORE *et al.*, 2006; MARIGÓMEZ; BAYBAY-VILLACORTA, 2003).

Os resultados experimentais mostraram efeitos significativamente diferentes do controle, mesmo em baixas diluições. Considerando a ocorrência ambiental significativa de BCs em zonas costeiras, tais efeitos deletérios podem potencialmente se reproduzir em ambientes naturais contaminados por esse tipo de resíduo. As BC estão associadas a mais de 7.000 diferentes substâncias químicas, muitas das quais induzem toxicidade (CORTEZ *et al.*, 2018; OKAY; KARACIK, 2008; YANCHEVA *et al.*, 2018). No presente estudo, somente dois grupos de contaminantes foram investigados. A correlação entre os efeitos na estabilidade da membrana lisossômica e o aumento da concentração do lixiviado foi evidente, porém os metais não apresentaram variações representativas, indicando que as alterações observadas não são decorrentes desses elementos. Por outro lado, a variação inversa e proporcional entre os HPA e os efeitos observados sugerem que este grupo pode ter contribuído para as alterações das membranas lisossômicas. Entretanto, devido à complexidade da matriz das BC, é possível que os efeitos sejam resultantes dos HPA combinados com outras substâncias ou mesmo apenas dessas outras substâncias, como a nicotina e nitrosaminas, que já foram associadas a efeitos tóxicos na biota (CARLSON *et al.*, 2017; GREEN *et al.*, 2014; MONTALVÃO *et al.*, 2019).

5. CONCLUSÃO

As condições experimentais (salinidade e temperatura) para a lixiviação das BC utilizadas neste estudo favoreceram a remoção de altas concentrações de HPA mas não de metais. Os HPA de baixo peso molecular foram predominantes em comparação com os compostos de alto peso molecular, provavelmente em função de suas solubilidades, tendo o naftaleno como o composto de maior concentração em ambas as matrizes analisadas (água e organismos). Além da absorção pelos organismos, outros processos físico-químicos, tais como adesão às paredes dos aquários e adsorção ao material biológico particulado, contribuíram para a remoção dos HPA da coluna d'água ao longo dos experimentos. Não foi possível correlacionar os metais com danos observados, uma vez que não foram lixiviados em concentrações mensuráveis. Os HPA foram bioacumulados nos organismos e representaram um grupo provável de estressores capazes de causar instabilidade nas membranas lisossômicas. Entretanto, outros contaminantes associados às BCs podem estar contribuindo para os efeitos

observados no presente estudo. O tempo de exposição é um fator crucial na intensificação das alterações identificadas nas membranas lisossômicas dos mexilhões. A partir dos experimentos realizados, pode-se concluir que uma única BC tem potencial para contaminar e impactar os organismos presentes em aproximadamente 2.500 L de água, sendo capaz de causar alterações na membrana lisossômica nas primeiras 24 h de exposição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.de S.; ZARONI, L.P., SOUSA, E.C.P.M. de; GASPARRO, M.R.; PEREIRA, C.D.S.; RACHID, B.R. de F.; DEPLEDGE, M.; KING, R.S. Physiological and cellular responses in two populations of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. *Braz. arch. biol. technol.* 48, 217–225. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200008>. 2005.

ACH, A. Pure and Applied Chemistry Biodegradable Plastics Based on Cellulose Acetate BIODEGRADABLE PLASTICS BASED. *J Macromol Sci P A*, 37–41, 2006.

ADORATI, K. Effects of cigarette butts on coastal waters: an elemental analysis of seawater from St. **Simon’s Island**, 2016.

AKHBARIZADEH, R.; DOBARADARAN, S.; PARHIZGAR, G.; SCHMIDT, T.C.; MALLAKI, R. Potentially toxic elements leachate from cigarette butts into different types of water: a threat for aquatic environments and ecosystems? *Environmental research*, v. 202, p. 111706, 2021.

ARAUJO, D.G. **Avaliação dos efeitos de pellets e polímeros, oxi-biodegradável e hidrossolúvel, em ambientes marinhos utilizando sedimento marcado e mexilhões da espécie *Mytella charruana***. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARAUJO, M.C.B.; COSTA, M.F. A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environ Res*, 172 (January): 137–149, 2019.

AVIO, C.G.; GORBI, S.; MILAN, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; d’ERRICO, G.; PAULETTO, M.; BARGELLONI, L.; REGOLI, F. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution* 198, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.021>. 2015.

BAILEY, William A. Herbicides used in tobacco. **Herbicides: Current Research and Case Studies in Use**. IntechOpen, p. 175-199, 2013.

BAPTISTA NETO, J. A. Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BAPTISTA NETO, J. A.; PONZI, V. R. A.; SICHET, S. E. (org.). Introdução à geologia marinha.

BONANOMI, G.; INCERT, G.; CESARANO, G.; GAGLIONE, S.A.; LANZOTTI, V. Cigarette butt decomposition and associated chemical changes assessed by ¹³C CPMAS NMR. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0117393, 2015.

BRANDIMARTE, A.L.; ANAYA, M.; SHIMIZU, G.Y. Downstream impact of Mogi-Guacu River damming on the benthic Invertebrates (Sao Paulo State, Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 17, n. 1, p. 27-36, 2005.

BURNS, K.A.; GARRITY, S.D.; JORISSEN, D.; MacPHERSON, J.; STOELTING, M.; TIERNEY, J.; YELLE-SIMMONS, L. The Galeta Oil Spill II. Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, 38: 349-364p. 1994.

CAMPOS, B.G. de; FONTES, M.K.; GUSSO-CHOUERI, P.K.; MARINSEK, G.P.; NOBRE, C.R.; MORENO, B.B.; ABREU, F.E.L.; FILLMANN, G.; de BRITTO MARI, R.; de SOUZA ABESSA, D.M. A preliminary study on multi-level biomarkers response of the tropical oyster *Crassostrea brasiliiana* to exposure to the antifouling biocide DCOIT. **Marine Pollution Bulletin** 174, 113241. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113241>. 2022

CARLSON, E.S.; UPADHYAYA, P.; HECHT, S.S. A general method for detecting nitrosamide formation in the in vitro metabolism of nitrosamines by cytochrome P450s. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 127, 2017.

CATHERINE, T.; VANESSA, M.; EVANGELIA, S.; VALENTINA, C.; ANDREJA, R.; RANA, A.A.; SUSANA, C.; SERENA, F.; ALISA, K.; YIOTA, L.; IOANNIS, H.; ANDRA, O.; DANIELA, T. Biochemical biomarker responses to pollution in selected sentinel organisms across the Eastern Mediterranean and the Black Sea. **Environ Sci Pollut Res**, 23 (2): 1789–1804, 2016.

CHIOVATTO, A.C.L.; de GODOI, A.V.O.; ZANARDI-LAMARDO, E.; DUARTE, F.A.; DELVALLS, T.Á.; PEREIRA, C.D.S.; CASTRO, Í.B. Effects of substances released from a coal tar-based coating used to protect harbor structures on oysters. **Mar Pollut Bull**, 166: 112221, 2021.

- CORRAINI, N.R.; de SOUZA de LIMA, A.; BONETTI, J.; RANGEL-BUITRAGO, N. Troubles in the paradise: Litter and its scenic impact on the North Santa Catarina Island beaches, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** 131, 572–579. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.061>. 2018.
- CORTEZ, F.S. Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação emergente na baía de Santos, SP. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo 2018.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, 31, 1820-1830. 2008.
- DAI, P.; CONG, P.; WANG, P.; DONG, J.; DONG, Z.; SONG, W. Alleviating soil acidification and increasing the organic carbon pool by long-term organic fertilizer on tobacco planting soil. **Agronomy**, v. 11, n. 11, p. 2135, 2021.
- da SILVA, N.F.; de ARAÚJO, M.C.B.; SILVA-CAVALCANTI, J.S. Spatio-temporal distribution of cigarette butt contamination in urban beaches with varying levels of use. **Waste Management**, v. 168, p. 179-188, 2023.
- de SOUZA ABESSA, D.M.; ORTEGA, A.D.S.B.; MARINSEK, G.P.; ROSELLI, L.Y.; CHELOTTI, L.D.D.; PERINA, F.C. Acute Toxicity of Cigarette Butts Leachate on Nauplii of *Artemia sp.* **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 659-670, 2021.
- DÍAZ-MENDOZA, C.; ORDIALES, P.A.; BUSTOS, M.L.; CERVANTES, O.; PALACIOS-MORENO, M.; SAN-MARTIN, T.V.; ... GUITIÉRREZ, L. Abundance and distribution of cigarette butts on the sand of five touristic beaches in Latin America during the COVID-19 pandemic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 194, p. 115306, 2023.
- di GIACOMO, S.; MAZZANTI, G.; di SOTTO, A. Mutagenicity of cigarette butt waste in the bacterial reverse mutation assay: The protective effects of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1319-1328, 2016.
- DOBARADARAN, S.; SCHMIDT, T. C.; NABIPOUR, I.; OSTOVAR, A.; RAEISI, A.; SAEEDI, R.; KHORSAND, M.; KHAJEAHMADI, N.; KESHTKAR, M. Cigarette butts abundance and association of mercury and lead along the Persian Gulf beach: An initial investigation. **Environmental Science and Pollution Research**. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0676-9>, 2017.

- DOBARADARAN, S.; SCHMIDT, T.C.; LORENZO-PARODI, N.; JOCHMANN, M.A.; NABIPOUR, I.; RAEISI, A.; STOJANOVIĆ, N.; MAHMOODI, M. Cigarette butts: an overlooked source of PAHs in the environment? **Environmental pollution**. 249, 932–939. 2019.
- DOBARADARAN, S.; SCHMIDT, T.C.; LORENZO-PARODI, N.; KAZIUR-CEGLA, W.; JOCHMANN, M.A.; NABIPOUR, I.; LUTZE, H.V.; TELGHEDER, U. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) leachates from cigarette butts into water. **Environmental Pollution**. 259, 113916. 2020.
- DOBARADARAN, S.; SCHMIDT, T.C.; NABIPOUR, I.; OSTOVAR, A.; RAEISI, A.; SAEEDI, R.; KHORSAND, M.; KHAJEAHMADI, N.; KESHTKAR, M. Cigarette butts abundance and association of mercury and lead along the Persian Gulf beach: an initial investigation. **Environ Sci Pollut Res**, 25 (6): 5465–5473, 2018.
- DOBARADARAN, S.; SOLEIMANI, F.; AKHBARIZADEH, R.; SCHMIDT, T.C.; MARZBAN, M.; BASIRIANJAHROMI, R. Environmental fate of cigarette butts and their toxicity in aquatic organisms: A comprehensive systematic review. **Environmental Research**, v. 195, p. 110881, 2021.
- dos SANTOS, M.C. **Níveis de elementos potencialmente tóxicos na água e no sururu da Lagoa Mundaú (Alagoas, Brasil): contaminação ambiental e potencial exposição à saúde humana**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Alagoas.
- ENGLER, R.E. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 22, p. 12302-12315, 2012.
- FISCHER, S.; THÜMMLER, K.; VOLKERT, B.; HETTRICH, K.; SCHMIDT, I.; FISCHER, K. Properties and applications of cellulose acetate. **Macromolecular Symposia**, v. 262, n. 1, p. 89–96, 2008.
- FRANCIONI, E.; DE, L.R.; WAGENER, A.; SCOFIELD, A.L.; DEPLEDGE, M.H.; CAVALIER, B. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects. **Marine Pollution Bulletin**. 54, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.11.003>. 2007.
- GALGANI, F.; o-BRIEN, A.S.; WEIS, J.; IOAKEIMIDIS, C.; SCHULER, Q.; MAKARENKO, I.; GRIFFITHS, H.; BONDAREFF, J.; VETHAAK, D.; DEIDUN, A.; SOBRAL, P.; TOPOUZELIS, K.; VLAHOS, P.; LANA, F.; HASSELLOV, M.; GERIGNY,

- O.; ARSONINA, B.; AMBULKAR, A.; AZZARO, M.; BEBIANNO, M.J. Are litter, plastic and microplastic quantities increasing in the ocean? **Microplastics and Nanoplastics**, v. 1, p. 1-4, 2021.
- GALL, S.C.; THOMPSON, R.C. The impact of debris on marine life. **Marine Pollution Bulletin** 92, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.041>. 2015.
- GARCÉS-ORDÓÑEZ, O.; DÍAZ, L.F.E.; CARDOSO, R.P.; MUNIZ, M.C. The impact of tourism on marine litter pollution on Santa Marta beaches, Colombian Caribbean. **Marine pollution bulletin**, v. 160, p. 111558, 2020.
- GARCIA, M.R.; MIRLEAN, N.; MACHADO, M.I.; CARAMAO, E.B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) contamination in aquatic environments adjacent to areas of multiple uses: to whom is that environmental liability? Conference: Rio oil and gas expo and conference 2004, Rio de Janeiro, RJ (Brazil), 4-7 Oct 2004.
- GREEN, A.L.R.; PUTSCHEW, A.; NEHLS, T. Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. **Journal of hydrology**, v. 519, p. 3466-3474, 2014.
- GREEN, D.S.; TONGUE, A.D.W; BOOTS, B. The ecological impacts of discarded cigarette butts. **Trends in ecology & evolution**, v. 37, n. 2, p. 183-192, 2022.
- GRIZ, J.de A.S. **Contaminantes orgânicos em um testemunho sedimentar do Mangue do Rio Taperaçu-PA**. 2021.Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco.
- HARRIS, B., The intractable cigarette “filter problem.” **Tobacco Control** 20, 10–16. <https://doi.org/10.1136/tc.2010.040113>. 2011.
- HARTMANN, P.C.; QUINN, J.Q.; CAIRNS, R.W.; KJING, J.W. Depositional history of organic contaminants in Narragansett Bay, Rhode Island, USA. **Marine pollution bulletin**, v. 50, n. 4, p. 388-395, 2005.
- HECHT, S.S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. **Chemical research in toxicology**, v. 11, n. 6, p. 559-603, 1998.
- HOORNWEG, D.; BHADA-TATA, P.; KENNEDY, C. Environment: Waste production must peak this century. **Nature** 502, 615–7. <https://doi.org/10.1038/502615a>. 2013.
- ISTOMINA, A.; MAZUR, A.; CHELOMIN, V.; KUKLA, S.; SLOBODSKOVA, V.; ZVYAGINTSEV, A.; KOLOSOVA, L.; ZHUKOVSKAYA, A.; FEDORETS, Y. The

- different biomarkers in the assessment of the marine environmental quality using the representative species *Mytilus trossulus*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, p. 1-13, 2020.
- ITO, H.; MATSUO, K.; TANAKA, H.; KOESTLER, D.C.; OMBAO, H.; FULTON, J.; SHIBATA, A.; FUJITA, M.; SUGIYAMA, H.; SODA, M.; SOBUE, T.; MOR, V., Nonfilter and filter cigarette consumption and the incidence of lung cancer by histological type in Japan and the United States: Analysis of 30-year data from population-based cancer registries. **International Journal of Cancer** 128, 1918–1928. <https://doi.org/10.1002/ijc.25531>. 2011.
- JOHANSSON, A.C.; APPELQVIST, H.; NILSSON, C.; KÅGEDAL, K.; ROBERG, K.; ÖLLINGER, K. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. **Apoptosis**, v. 15, p. 527-540, 2010.
- KHANMOHAMMADI, A.; JALILI, A.; PEGAH, G.; ABBAS, H.; FABIANA, A. An overview to electrochemical biosensors and sensors for the detection of environmental contaminants. **Journal of the Iranian Chemical Society**. <https://doi.org/10.1007/s13738-020-01940-z>. 2020.
- KIM, B.S.M.; SALAROLI, A.B.; de LIMA FERREIRA, P.A.; SARTORETTO, J.R.; de MAHIQUES, M. M.; FIGUEIRA, R.C.L. Spatial distribution and enrichment assessment of heavy metals in surface sediments from Baixada Santista, Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 103, n. 1-2, p. 333-338, 2016.
- KOUTELA, N.; FERNÁNDEZ, E.; SARU, M. L.; PSILLAKIS, E. A comprehensive study on the leaching of metals from heated tobacco sticks and cigarettes in water and natural waters. **Science of the total environment**, v. 714, p. 136700, 2020.
- KUNGSKULNITI, N.; CHAROENCA, N.; HAMANN, S. L.; PITAYARANGSARIT, S.; MOCK, J. Cigarette waste in popular beaches in Thailand: High densities that demand environmental action. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040630>, 2018.
- KUPPUSAMY, S.; PALANISAMI, T.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2016.
- KURMUS, H.; MOHAJERANI, A. The toxicity and valorization options of cigarette butts. **Waste Management**, v. 104, p. 104-118, 2020.

- LARANJEIRA, D. **Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para invertebrados aquáticos. 2019. 115f.** 2019. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) -Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- LAWRENCE, D.R.; SCOTT, G.I. The determination and use of condition index of oysters. **Estuaries**, v. 5, p. 23-27, 1982.
- LEE, W.; LEE, C.C. Developmental toxicity of cigarette butts—An underdeveloped issue. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 362-368, 2015.
- LEVINGS, S. C.; GARRITY, S. D.; VAN VLEET, E. S.; WETZEL, D. L. Sublethal injury to red mangroves two years after oiling. In: **International Oil Spill Conference**. American Petroleum Institute, p. 1040-1041. 1997.
- LILIUS, H.; HÄSTBACKA, T.; ISOMAA, B. A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 14, n. 12, p. 2085-2088, 1995.
- LIMA, C.; AMARAL, dos S.P., M., CHOUERI, R.B.; MOREIRA, L.B.; CASTRO, Í.B. Occurrence, characterization, partition, and toxicity of cigarette butts in a highly urbanized coastal area. **Waste Management** 131, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.029>. 2021.
- LISUMA, J.B.; MBEGA, E.R.; NDAKIDEMI, P.A. The effects of cultivating tobacco and supplying nitrogenous fertilizers on micronutrients extractability in loamy sand and sandy soils. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1597, 2021.
- LIU, L.; BILAL, M.; DUAN, X.; IQBAL, M.N. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria — Current challenges and future perspectives. **Science of the Total Environment**. 667, 444–454. 2019.
- LÓPEZ DÁVILA, E.; HOUBRAKEN, M.; de ROP, J.; WUMBEL, A.; du LAING, G.; ROMERO ROMERO, O.; SPANOGHE, P. Pesticides residues in tobacco smoke: risk assessment study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, p. 1-15, 2020.
- LOURENÇO, M.G.; OLIVEIRA, M.C. A espectrometria de massa na análise das N-nitrosaminas do tabaco e fumo do tabaco. **Anais do Instituto Superior de Agronomia**, 1997.

- LÜCHMANN, K.H.; CLARK, M.S.; BAINY, A.C.D.; GILBERT, J.A.; CRAFT, J.A.; CHIPMAN, J.K.; THORNE, M.A.S.; MATTOS, J.J.; SIEBERT, M.N.; SCHROEDER, D.C. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aqua Toxicol**, 166, 10–20, 20. 2015.
- LUCIA, G.; GIULIANI, M.E.; d'ERRICO, G.; BOOMS, E.; BENEDETTI, M.; di CARLO, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S.; REGOLI, F. Toxicological effects of cigarette butts for marine organisms. **Environment International**. 171, 107733. 2023.
- MacLEOD, M.; ARP, H.P.H.; TEKMAN, M.B.; JAHNKE, A. The global threat from plastic pollution. **Science**, v. 373, n. 6550, p. 61-65, 2021.
- MADENJIAN, C.P.; UNREIN, J.R.; PEDRO, S. Trends and biological effects of environmental contaminants in lamprey. **Journal of Great Lakes Research**. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.08.014>. 2020.
- MANSOURI, N.; ETEBARI, M.; EBRAHIMI, A.; EBRAHIMPOUR, K.; RAHIMI, B.; HASSANZADEH, A. Arsenic content of cigarette butt leachate of five cigarette brands into water. **International Journal of Environmental Health Engineering**, v. 9, n. 1, p. 13, 2020.
- MANSOURI, N.; ETEBARI, M.; EBRAHIMI, A.; EBRAHIMPOUR, K.; RAHIMI, B.; HASSANZADEH, A. Genotoxicity and phytotoxicity comparison of cigarette butt with cigarette ash. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 40383-40391, 2020.
- MARIGÓMEZ, I; BAYBAY-VILLACORTA, L. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 235-257, 2003.
- 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. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 4, p. 490-499, 2008.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; BIGNELL, J.; LOWE, D. Lysosomal membrane stability in mussels. 2015.

- MEIRE, R.O.; AZEREDO, A.; TORRES, J.P.M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ecologia brasiliensis**. 11.2: 188-201. 2007.
- MELO, F. R. **Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivípara***. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco. 2011.
- MOERMAN, J.W.; POTTS, G.E. Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. **Tobacco control**, v. 20, n. Suppl 1, p. i30-i35, 2011.
- MONTALVÃO, M.F.; CHAGAS, T.Q.; da SILVA ALVAREZ, T.G.; MESAK, C.; da COSTA ARAÚJO, A.P.; GOMES, A.R.; MALAFAIA, G. How leachates from wasted cigarette butts influence aquatic life? A case study on freshwater mussel *Anodonta trapesiali*. **Science of the Total Environment**, v. 689, p. 381–389, Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.385>>. 2019.
- MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Marine Environmental Research**, v. 61, n. 3, p. 278-304, 2006.
- MOORE, M.N.; ALLEN, J.I.; McVEIGH, A.; SHAW, J. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. **Autophagy**, 2(3):217-220.
- MÜLLER, M.N., YOGUI, G.T., GÁLVEZ, A.O., de SALES JANNUZZI, L.G., de SOUZA FILHO, J.F., MONTES, M.D.J.F., ... & ZANARDI-LAMARDO, E. Cellular accumulation of crude oil compounds reduces the competitive fitness of the coral symbiont *Symbiodinium glynnii*. **Environmental Pollution**, v. 289, p. 117938, 2021.
- NAPPER, I.E.; THOMPSON, R.C. Plastic debris in the marine environment: history and future challenges. **Global Challenges**, v. 4, n. 6, p. 1900081, 2020.
- NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M.S. Anatomia funcional de *Mytella charruana* (D'Orbigny, 1846) (Bivalvia: Mytilidae). **Boletim de Zoologia**, v. 6, n. 6, p. 113-145, 1983.
- NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**, G.M. Randand S.R. Petrocelli (Eds.). Hemisphere Publ. Corp., New York, USA. 416-454p. 1985.
- NETO, J.A. B.; WALLNER-KERSANACH, M. **Poluição marinha**. Interciência, 2008.
- NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos

- policíclicos aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. **Química Nova**, 23 (6): 765-773p. 2000.
- NICHOLSON, S.; LAM, P. K. S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). **Environment International**, v. 31, n. 1, p. 121-132, 2005.
- NOVOTNY, T.E.; LUM, K.; SMITH, E.; WANG, V.; BARNES, R. Cigarettes butts and the case for an environmental policy on hazardous cigarette waste. **Int J Environ Res Public Health**, 6 (5): 1691–1705, 2009.
- NOVOTNY, T.E.; SLAUGHTER, E. Tobacco Product Waste: An Environmental Approach to Reduce Tobacco Consumption. **Curr Environ Health Rep**, 1, 3, 208–216, 2014.
- Ocean Conservancy, 2011. Tracking Trash: 25 Years of Action for the Ocean. International Coastal Cleanup 25th Anniversary Report.
- OKAY, O.S.; KARACIK, B. Bioconcentration and phototoxicity of selected PAHs to marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 43, n. 11, p. 1234-1242, 2008.
- PATTIARATCHI, C.; van der MHEEN, M.; SCHLUNDT, C.; NARAYANASWAMY, B.E.; SURA, A.; HAJBANE, S.; WHITE, R.; KUMAR, N.; FERNANDES, M.; WIJERATNE, S. Plastics in the Indian Ocean—sources, fate, distribution, and impacts. **Ocean Science Discussions**, v. 2022, p. 1-40, 2022.
- PEREIRA, B.D.F.M.; ALVES, B.M.; MEDEIROS, M.P.; PEREIRA, R.M. Contaminação no lençol freático, rios, lagos e lagoas do Brasil por agrotóxicos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 7, p. 863-874, 2022.
- PEREIRA, C.D.S.; de SOUZA, D.M. A.; BAINY, A.C.D.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.R.; BICEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T.H.; de SOUSA, E.C.P.M. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. 26, 462–469. 2007.
- PEREIRA, S.M.; FERNÁNDEZ-TAJES, J.; RÁBADE, T.; FLÓREZ-BARRÓS, F.; LAFFON, B.; MÉNDEZ, J. Comparison between two bivalve species as tools for the assessment of pollution levels in an estuarine environment. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 74, n. 15-16, p. 1020-1029, 2011.

- POPPENDIECK, D.; KHURSHID, S.; EMMERICH, S. Measuring airborne emissions from cigarette butts: literature review and experimental plan. **National Institute of Standards and technology US Department of commerce: Gaithersburg, MA, USA, 2016.**
- PUSCEDDU, F.H. **Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno e 17 α -etinilestradiol empregando invertebrados marinhos bentônicos.** 2016. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
- RIBEIRO, E. **Efeitos de concentrações subletais dos Hidrocarbonetos Poliaromáticos específicos BTX (Benzeno Tolueno e Xileno) no peixe *Sphoeroides testudineus* (LINNAEUS, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.
- RIBEIRO, V. V.; HARAYASHIKI, C. A. Y.; ERTAŞ, A.; CASTRO, Í. B. Anthropogenic litter composition and distribution along a chemical contamination gradient at Santos Estuarine System—Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v. 46, p. 101902, 2021.
- RIBEIRO, V.V.; PINTO, M.A., MESQUITA, R.K.; MOREIRA, L.B.; COSTA, M.F.; CASTRO, Í.B. Marine litter on a highly urbanized beach at Southeast Brazil: a contribution to the development of litter monitoring programs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 163, p. 111978, 2021.
- ROCHMAN, C.M.; BROWNE, M.A.; UNDERWOOD, A.J.; VAN FRANEKER, J.A.; THOMPSON, R.C.; AMARAL-ZETTLER, L.A. The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. **Ecology** 97, 302–312. 2016.
- RODRIGUEZ-ARIZA, A.; ABRIL, N.; NAVAS, J.I.; DORADO, G.; LÓPEZ-BAREA-ARIZA, J.; PUEYO, C. Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 112-124, 1992.
- ROSA, Hytalo de Souza. **Avaliação da toxicidade de lixiviado de bitucas de cigarro sobre *Crassostrea brasiliiana*.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2023.

- ROSELLI, C.; FAGIOLINO, I.; DESIDERI, D.; SISTI, D.; MELI, M.A. Assessment of the release of metals from cigarette butts into the environment. **Plos one**, v. 16, n. 11, p. e0260111, 2021.
- SABBATINI, A.; CARIDI, F.; BIRARDA, G.; COSTANZI, E.; AMICI, A.; MOBBILI, G.; BUOSI, C.; de GIUDICI, G.; MEDAS, D.; NEGRI, A. Response of Foraminifera to Anthropogenic Nicotine Pollution of Cigarette Butts: An Experimental Approach. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 11, n. 10, p. 1951, 2023.
- SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 243-248, 2002.
- SANTOS-ECHEANDÍA, J.; ZÉLER, A.; GAGO, J.; LACROIX, C. The role of cigarette butts as vectors of metals in the marine environment: Could it cause bioaccumulation in oysters? **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125816, 2021.
- SOARES, Célia Regina Araújo. Concentração de metais pesados em sedimento, água e macrófitas aquáticas em duas represas do município de Viçosa, MG. 2006.
- SOLEIMANI, F.; DOBARADARAN, S.; de-la-TORRE, G.E.; SCHMIDT, T.C.; SAEEDI, R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. **Science of the Total Environment**. 813, 152667. 2022b.
- SOLEIMANI, F.; DOBARADARAN, S.; MOHEBBI, G.; VAZIRIZADEH, A.; de-la-TORRE, G.; SAEEDI, R.; NABIPOUR, I.; NOVOTNY, T.E.; SCHMIDT, T.C. Toxic effect of cigarette butts leachates on blood markers of *Periophthalmus waltoni* species from the Persian Gulf region. **Chemosphere**, v. 319, p. 138036, 2023.
- SOLEIMANI, F.; DOBARADARAN, S.; VAZIRIZADEH, A.; MOHEBBI, G.; RAMAVANDI, B.; de-la-TORRE, D.E.; NABIPOUR, I.; SCHMIDT, T.C.; NOVOTNY, T.E.; MARYAMABADI, A.; KORDROSTAMI, Z. Chemical contents and toxicity of cigarette butts leachates in aquatic environment: a case study from the Persian Gulf region. **Chemosphere**, v. 311, p. 137049, 2022a.
- STELLMAN, S. D.; MUSCAT, J. E.; THOMPSON, S.; HOFFMANN, D.; WYNDER, E. L. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime

- filter cigarette smoking. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**. 80(3), 382-388, 1997.
- SUN, S.; SHI, W.; TANG, Y.; HAN, Y.; DU, X.; ZHOU, W.; SUN, C.; LIU, G. The toxic impacts of microplastics (MPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on haematic parameters in a marine bivalve species and their potential mechanisms of action. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 147003, 2021.
- SZCZYBELSKI, A.S.; DIEPENS, N.J.; van den HEUVEL-GREVE, M.J. ; van den BRINK, N.W. ; KOELMANS, A.A. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by arctic and temperate benthic species. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 38, n. 4, p. 883-895, 2019.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.
- TORREIRO-MELO, A.G.A.G. **Biorremediação de sedimento lamoso contaminado por petróleo e derivados sobre o cópepodo harpactíóide *Tisbe bimininiensis***. Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- TREVIZANI, T.H.; DOMIT, C.; SANTOS, M.C.D.O.; FIGUEIRA, R.C.L. Bioaccumulation of heavy metals in estuaries in the southwest Atlantic Ocean. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 10, p. 26703-26717, 2023.
- UNEP, 2016. Marine Plastic Debris and Microplastics: Global Lessons and Research to Inspire Action and Guide Policy Change. UN.
- UNEP, M.L., 2009. A Global Challenge. UNEP, Nairobi.
- VANAPALLI, K.R.; SHARMA, H.B.; ANAND, S.; RANJAN, V.P.; SINGH, H.; DUBEY, B.K.; MOHANTY, B. Cigarettes butt littering: The story of the world's most littered item from the perspective of pollution, remedial actions, and policy measures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 453, p. 131387, 2023.
- WAYMAN, C.; NIEMANN, H. The fate of plastic in the ocean environment—a minireview. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 23, n. 2, p. 198-212, 2021.
- WOODS, J. S.; VERONES, F.; JOLLIET, O.; VÁZQUEZ-ROWE, I.; BOULAY, A. M. A framework for the assessment of marine litter impacts in life cycle impact assessment. **Ecological Indicators**, v. 129, p. 107918, 2021.

- WRIGHT, S.L., ROWE, D.; REID, M.J.; THOMAS, K.V.; GALLOWAY, T.S. Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms. **Sci Rep**, 5: 1–10, 2015.
- YABE, M; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, 21:551-556, 1998.
- YANCHEVA, V.; GEORGIEVA, E.; STOYANOVA, S.; TSVETANOVA, V.; TODOROVA, K.; MOLLOV, I.; VELCHEVA, I. Short-and long-term toxicity of cadmium and polyaromatic hydrocarbons on zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Bivalvia: Dreissenidae). **Acta Zoologica Bulgarica** 70, 557–564. 2018.
- ZAGATTO, A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações – segunda edição. São Carlos: RiMa, ISBN – 978-85-7656-136-1. 2008
- ZENG, Y.; YANG, H. Review of molluscan bivalve condition index calculations and application in Northern Quahogs *Mercenaria mercenaria*. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 1, p. 23-36, 2021.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais no lixiviado.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos				Metais	
Baixo Peso Molecular		Alto Peso Molecular			
ng L ⁻¹				mg L ⁻¹	
Naftaleno	1488	Fluoranteno	4,85	As	ND
C1- Naftaleno	165	Pireno	4,93	Cd	ND
C2- Naftaleno	293	C1- Pireno	7,44	Cr	ND
C3- Naftaleno	61,0	C2- Pireno	<2,5*	Cu	0,053
Acenaftileno	29,7	Benzo[a]antraceno	5,19	Fe	0,045
Acenafteno	6,68	Criseno	<2,5*	Ni	<0,020*
Fluoreno	11,3	C1 Criseno	<2,5*	Pb	<0,033*
C1- Fluoreno	ND	C2 Criseno	<2,5*	Zn	0,06
C2- Fluoreno	<2,5*	Benzo[b]fluoranteno	ND		
Fenantreno	49,9	Benzo[k]fluoranteno	ND		
C1- Fenantreno	<2,5*	Benzo[e]pireno	ND		
C2- Fenantreno	<2,5*	Benzo[a]pireno	12,2		
Antraceno	10,1	Perileno	ND		
		Indeno[123cd]pireno	ND		
		Dibenzo[ah]antraceno	<2,5*		
		Benzo[ghi]perileno	ND		
Total	2149				
ΣLMW	2105	ΣHMW	17,41		
LMW/Total	97,9%	HMW/Total	0,81%		

* – Limite de quantificação de cada analito;

Fonte: A autora (2024)

Tabela S2. Concentração dos metais nos aquários no momento T₀ de ambos os experimentos de exposição.

Unidades	T ₀												
	Lixiviado	Aclimação	24h					120h					CC
			Controle	0,01	0,1	1	10	Controle	0,01	0,1	1	10	
	mg L ⁻¹												
As	ND	0,091	0,104	0,058	0,071	0,061	<0,044*	0,085	<0,044*	0,045	0,046	<0,044*	0,106
Cd	ND	ND	<0,008*	<0,008*	<0,008*	ND	ND	ND	ND	<0,008*	ND	ND	ND
Cr	ND	<0,010*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cu	0,053	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*
Fe	0,045	0,02	0,014	0,028	0,011	0,014	0,017	0,01	0,009	0,013	0,024	0,013	0,011
Ni	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	ND	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	ND	<0,020*	<0,020*
Pb	<0,033*	<0,033*	<0,033*	ND	<0,033*	ND	<0,033*	<0,033*	<0,033*	ND	<0,033*	<0,033*	<0,033*
Zn	0,06	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*

* – Limite de quantificação de cada analito;

CC – Controle dos contaminantes;

ND = não detectado.

Fonte: A autora (2024)

Tabela S3. Concentração dos metais nos aquários ao final dos dois tempos de exposição.

Unidades	T ₁						T ₂					
	Controle	0,01	0,1	1	10	CC	Controle	0,01	0,1	1	10	CC
mg L ⁻¹												
As	<0,044*	0,075	<0,044*	<0,044*	0,086	0,088	<0,044*	0,077	<0,044*	0,097	<0,044*	<0,044*
Cd	ND	<0,008*	<0,008*	ND	ND	ND	ND	<0,008*	<0,008*	<0,008*	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<0,010*	ND	ND	ND	ND	ND
Cu	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*	<0,016*
Fe	0,020	0,011	0,022	0,013	0,038	0,011	0,063	0,013	0,010	0,013	0,015	0,010
Ni	<0,020*	<0,020*	ND	ND	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	<0,020*	ND	<0,020*
Pb	ND	ND	ND	ND	<LQ	<LQ	ND	<LQ	ND	<LQ	<LQ	ND
Zn	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*	<0,032*

* – Limite de quantificação de cada analito;

CC – Controle dos contaminantes;

ND = não detectado.

Fonte: A autora (2024)