



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí  
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

**Biomarcadores comportamentais e mutagênico em  
*Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) expostos a  
lixiviado de bitucas de cigarro**

**MATEUS FLORES MONTALVÃO**

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia**

Urutaí, fevereiro de 2019



## **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano**

*Reitor*

Prof. Dr. Vicente Pereira Almeida

*Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

### **Campus Urutaí**

*Diretor Geral*

Prof. Dr. Gilson Dourado da Silva

*Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. André Luís da Silva Castro

## **Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado**

*Coordenador*

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Urutaí, fevereiro de 2019

MATEUS FLORES MONTALVÃO

**Biomarcadores comportamentais e mutagênico em  
*Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) expostos a  
lixiviado de bitucas de cigarro**

*Orientador*

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –  
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais  
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)

2019

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIB/IF Goiano

M762b Montalvão, Mateus Flores.

Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) expostos a lixiviado de bitucas de cigarro / Mateus Flores Montalvão. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2019.

57 fls.

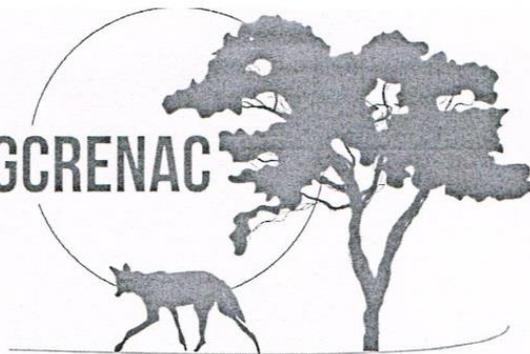
Orientador: Dr. Guilherme Malafaia.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2019.

1. Bivalves. 2. Concentração ambiental. 3. Nicotina. 4. Teste do micronúcleo.  
I. Malafaia, Guilherme. II. Título.

CDU 58

PPGCRENAC



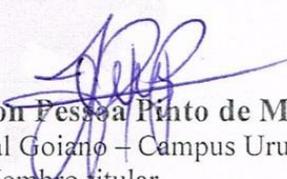
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

## FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

|                        |   |
|------------------------|---|
| Título da dissertação: | Biomarcadores comportamentais e mutagênicos em moluscos bivalves ( <i>Anodonta trapezialis</i> Lomax, 1819) expostos a lixiviado de bitucas de cigarro. |
| Orientador:            | Prof. Dr. Guilherme Malafaia  |
| Autor:                 | Mateus Flores Montalvão   |

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em 18 de fevereiro de 2019, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:

  
Prof. Dr. **Guilherme Malafaia**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai  
Presidente

  
Prof. Dr. **Ivandilson Fesosa Pinto de Menezes**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutai  
Membro titular

  
Prof.ª Dra. **Wanessa Fernandes Carvalho**  
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia  
Membro titular

*“Não importa quantas vezes você  
acertou. Você sempre será lembrado  
pelo seu erro ”*

*(Rosanagela Pontes)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus familiares mais próximos, meus pais e irmãos por ter me motivado e incentivado a dar continuidade aos estudos e por ter me dado condições para isso.

Agradeço também aos meus avôs pelos conselhos sábios que me encaminharam para as melhores escolhas, pela bela companhia, pelas histórias linda que eles sempre me contavam quando estava me sentido desmotivado. Agradeço em especial minha Avó querida Maria Rodrigues Flores, que Deus a tenha.

Quero agradecer a todas as amizades que construí em Urutaí e nas cidades vizinhas, dentre estas amizades, muitas duradouras, quero agradecer aos meus amigos de coração Eduardo de Alcântara, Rafael Lopes, Carlos Mesak, Caroliny Fátima Chaves da Paixão, João Arthur, Letícia Silva Cardoso, Joyce Moreira Souza, Abraão Tiago Batista Guimarães, Wellington Alves Mizael da Silva, Bruna de Oliveira Mendes, Fernanda Estrela dentre cujo nome não lembro neste momento.

Quero agradecer ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí pelas grandes oportunidades, pela excelente qualidade no ensino e educação, pelas bolsas que fui adquirindo ao longo dos 6 anos que fui residente nesta Instituição, agradeço a todos os professores que participaram diretamente e indiretamente da minha formação.

Agradeço com imenso amor e carinho a Laboratório de Pesquisas Biológicas pelas oportunidades e por acreditar no meu trabalho, pelas belas conquistas que tive nos 3 anos que fui membro da equipe do laboratório.

Agradeço em especial a uma grande pessoa que participou fortemente da minha formação acadêmica, profissional e pessoal ao Professor Guilherme Malafaia. Quando mais ninguém acreditava em mim, ele me tirou dos corredores da faculdade e me levou para o seu laboratório e me “lapidou” aos poucos igual a um “diamante bruto”. Foi graças a você Guilherme que eu amadureci e tornei quem sou hoje. Obrigado por todas as oportunidades que tive ao seu lado, e desculpe-me por todos os fios brancos de cabelo que fiz você adquirir ao longo de todos estes anos que estive sobre o seu comando.

Por fim, agradeço o Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí pela concessão de minha bolsa de estudos e ao Programa de mestrado PPGRENAC.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>   | <b>IX</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>24</b> |
| 2.1. Modelo experimental.....  | 24        |
| 2.2. Design experimental .....   | 25        |
| 2.3. Preparação do lixiviado de cigarro e determinação da diluição dos lixiviados de cigarro fumado..... | 26        |
| 2.4. Caracterização química do lixiviado.....  | 27        |
| 2.5. Testes comportamentais .....  | 28        |
| 2.5.1. Resposta antipredatória simulada.....   | 28        |
| 2.5.2. Ângulo de enterramento.....   | 29        |
| 2.5.3. Profundidade de enterramento.....   | 30        |
| 2.5.4. Percentual de exposição corpórea.....   | 31        |
| 2.5.5. Latência para emissão do pé.....  | 32        |
| 2.5.6. Latência para começar a escavar.....  | 33        |
| 2.5.7. Índice de enterramento.....   | 33        |
| 2.6. Coleta e contagem e diferencial de hemócitos.....   | 33        |
| 2.7. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares .....  | 34        |
| 2.8. Bioacumulação de metais.....  | 35        |
| 2.9. Análise estatística.....  | 35        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>4. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>48</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>48</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1-</b> Imagem ilustrativa do aparato utilizado para fumar os cigarros artificialmente .....  | 26 |
| <b>Figura 2-</b> Foto do Córrego Palmital ondem foram encontrados bitucas de cigarros fumados descartados de forma irregular.....  | 27 |
| <b>Figura 3-</b> Imagem ilustrativa do teste de resposta antipredatória simulada.....  | 29 |
| <b>Figura 4-</b> Imagem representativa do ângulo de inclinação dos bivalves quando o mesmo se encontrava enterrado .....   | 30 |
| <b>Figura 5-</b> Imagem ilustrativa da profundidade de enterramento, linha contínua vermelha representa o substrato areia, linha pontilhada representa parte do animal que se encontra enterrada no substrato .....  | 31 |
| <b>Figura 6-</b> Imagem ilustrativa do percentual de exposição corpórea durante 7 h de filmagem, após receber uma tentativa de predação simulada. Linha pontilhada delimita o corpo do animal, linha contínua divide a parte enterrada da parte externa exposta .....  | 32 |
| <b>Figura 7-</b> Imagem ilustrativa, movimentação do bivalve <i>A. trapesialis</i> para contrair e retraindo seu pé.....   | 33 |
| <b>Figura 8-</b> A) Fórmula estrutural atribuída aos íons mais intensos detectados na solução estoque do lixiviado de cigarros fumados obtida por ESI (-) Orbitrap MS. B) Fórmula estrutural atribuída aos íons mais intensos detectados na solução estoque do lixiviado de cigarros fumados obtida por ESI (+) Orbitrap MS..... | 37 |
| <b>Figura 9-</b> Massa inicial e final dos bivalves expostos ou não a água contaminada.....  | 38 |
| <b>Figura 10-</b> Latência para começar a escavar do bivalve <i>A. trapesialis</i> submetidos aos testes comportamentais expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x.....   | 39 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 11-</b> A) Imagem ilustrativa do comportamento de escavação Fase I, exibido pelo bivalve durante os testes comportamentais, (B) índice de ciclos de escavação, (C) latência .....                   | 41 |
| <b>Figura 12-</b> A) Percentual de exposição, (B) profundidade de enterramento.....   | 42 |
| <b>Figura 13-</b> A) Imagem ilustrativa do ângulo de enterramento, (B) ângulo de enterramento.....  | 42 |
| <b>Figura 14-</b> Micrografia de luz dos hemócitos de <i>A. trapesialis</i> expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados.....  | 44 |
| <b>Figura 15-</b> Total de micronúcleos identificados nos hemócitos do bivalve <i>A. trapesialis</i> submetidos aos testes comportamentais expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados..... | 44 |
| <b>Figura 16-</b> A) Hialinócitos binucleados, (B) percentual de células com alterações nucleares .....   | 45 |
| <b>Figura 17-</b> A) Concentração de Zn, (B) concentração de Mn do tecido muscular do bivalve <i>A. trapesialis</i> enterramento.....   | 46 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Levantamento Bibliográfico dos trabalhos que expuseram diferentes modelos experimentais de vertebrados e invertebrados a lixiviado de bitucas de cigarro.....                                    | 15 |
| <b>Tabela 2-</b> Caracterização química das águas utilizadas na exposição dos grupos controle, lixiviado 100% (Cardoso et al., 2018), concentração ambiental (CA1x) e concentração 10 vezes superior (CA10x)..... | 36 |

# Biomarcadores comportamentais e mutagênico em *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) expostos a lixiviado de bitucas de cigarro

## RESUMO

Atualmente os tipos de lixos mais encontrados no mundo estão relacionados ao consumo de cigarros. Estimasse para até o ano de 2025 o consumo de mais de 9 trilhões cigarros ao ano. Se não bastassem os impactos que os cigarros causam na saúde humana (tais como câncer de pulmão, câncer de bucal, hipertensão pulmonar arterial, tromboembólica pulmonar, envelhecimento precoce), mais recentemente temos observado que o lixiviado das bitucas fumadas pode ter impacto negativo sobre a biota, quando seus constituintes químicos chegam nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Visando compreender e identificar os impactos que esse poluente de alta complexidade pode causar na biota aquática, foram avaliados neste trabalho os efeitos da exposição (14 dias) do molusco bivalve *Anodontites trapesialis* a água contaminada com diluições do lixiviado de bitucas de cigarros fumadas que se aproximam de uma condição ambiental (isto é, ecologicamente relevantes). Ao final do período experimental avaliamos o comportamento de escavação e parâmetro imunológicos e mutagênicos. Nossos resultados comprovaram que grupos tratados com lixiviado de cigarro (CA1x e CA10x) apresentaram mudanças na resposta defensiva comportamental, redução nos ciclos de escavação, alterações imunológicas, mutagênica e maior concentração dos metais Zn e Mn na musculatura. Em conclusão, nosso estudo demonstra, pioneiramente, o impacto que lixiviado de bitucas de cigarros causa no comportamento de bivalves aquáticos, bem como, alterações imunológicas e mutagênicas.

**Palavras-chave:** Bivalves, Concentração ambiental, Nicotina, Teste do micronúcleo.

# **Behavioral and mutagenic biomarkers in *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) exposed to leachate of cigarette butts**

## **ABSTRACT**

Currently, the most common types of waste in the world are related to cigarette smoking. To consume up to the year 2025 the consumption of more than 9 trillion cigarettes a year. If the impacts of cigarettes on human health (such as lung cancer, oral cancer, pulmonary arterial hypertension, pulmonary thromboembolic disease, premature aging) were not enough, we have recently observed that the leachate of smoked butts may have a negative impact on biota when its chemical constituents reach terrestrial and aquatic ecosystems. In order to understand and identify the impacts of this highly complex pollutant on aquatic biota, the effects of exposure (bivalve mollusc) of *Anodontites trapesialis* to water contaminated with leaching dilutions of smoked cigarette butts of an environmental (ie ecologically relevant) condition. At the end of the experimental period, we assessed the behavior of excavation and immunological and mutagenic parameters. Our results showed that groups treated with cigarette leachate (CA1x and CA10x) showed changes in the behavioral defensive response, reduction in digging cycles, immunological alterations, mutagenicity and higher concentrations of Zn and Mn metals in the musculature. In conclusion, our study demonstrates, first of all, the impact that leachate of cigarette butts causes on the behavior of aquatic bivalves, as well as, immunological and mutagenic alterations.

**Keywords:** Bivalves, Environmental concentration, Nicotine, Micronucleus test.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da importância econômica da produção de tabaco no Brasil, gerando uma renda bruta de R\$ 15 bilhões ao ano (Mangel & Aquino, 2017), o descarte incorreto dos seus derivados no ambiente constitui grave problema mundial. Um dos tipos de lixo mais encontrados no mundo estão relacionados ao consumo de cigarros (Healton et al., 2011). Embora o impacto de uma única bituca seja mínima, no ano de 2002 foi estimado o consumo de mais de 5,6 trilhões de cigarros, sendo esperado para até o ano de 2025 um total de 9 trilhões ao ano (Mackay et al., 2006; Novotny et al., 2009), e o consumo diário de até 16 bilhões de cigarros (United Nations – online).

As bitucas de cigarros são encontradas em abundância em zonas urbanas (Schultz, 2009; Bator et al., 2011; Healton et al., 2011), compreendendo de 22% a 46% de todo lixo visível encontrado em ruas, rodovias e regiões costeiras (Novotny et al., 2009; Moriwaki et al., 2009; Scheneider et al., 2011; Seco Pon et al., 2012, Schultz et al., 2013). Essas bitucas contêm uma mistura complexa de substâncias/compostos químicos, incluindo a nicotina, substância altamente viciante, sendo altamente solúvel em água (Cardoso et al., 2018).

Estudos anteriores mostraram que a mistura dos compostos químicos presentes no lixiviado dos cigarros, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e etilfenóis, são extremamente tóxicos aos organismos (Micevska et al., 2006; Moriwaki et al., 2009; Moerman e Potts 2011; Lawal & Ologundudu, 2013; Parker & Rayburn 2017). Outros constituintes também presentes nas bitucas incluem os metais pesados, a exemplo do Cd, Fe, As, Ni, Cu, Zn, Mn. Vários estudos já mostram que estes elementos são liberados pelas bitucas de cigarros, o que pode ter diversos efeitos indesejados (e negativos) sobre o ambiente, biota e sobre a saúde humana (Moerman & Potts, 2011; Cobiina et al., 2015; Abbasi et al., 2015; Liu et al., 2015).

Uma das partes que constituem a maioria dos cigarros, em conjunto com o tabaco, mortalha, adesivos e outros eventuais dispositivos, como cápsulas, refere-se aos filtros, constituídos basicamente de acetato de celulose, um produto plástico (Novotny et al., 2009). Estes filtros podem desencadear efeitos negativos sobre o ambiente quando descartados de forma irregular. O filtro de cigarro presente nas bitucas é composto por uma haste com cerca de 12000 fibras, as quais podem ser liberadas durante o consumo, causando sérios danos para o homem e o meio ambiente (Hon, 1977; Hoellein et al., 2014; Novotny & Slaughtter, 2014). Um outro fator relacionado a estes filtros diz respeito ao seu potencial tóxico para o ambiente, pois apesar de o acetato ser fotodegradável, ele não é biodegradável (Puls et al., 2011). Mesmo que os raios ultravioletas o quebrem em pedaços menores, o material de origem não desaparece,

apenas é diluído no solo e na água em partículas menores (macraplástico ou microplástico) (Puls et al., 2011).

Se não bastassem os impactos que os cigarros causam na saúde humana (tais como câncer de pulmão, câncer bucal, hipertensão pulmonar arterial, tromboembólica pulmonar, envelhecimento precoce, dentre outros malefícios (Muwonge et al., 2008; Keusch et al., 2014; Yuan et al., 2017), mais recentemente temos observado que o lixiviado das bitucas fumadas pode ter impacto negativo sobre a biota, quando seus constituintes químicos chegam nos ecossistemas terrestres e aquáticos (Parker & Rayburn, 2017). As bitucas funcionam basicamente como carreadores de metais e outros compostos para o ambiente terrestre e aquático (dulcícola e marinho) (Dobaradaran et al., 2017), cuja liberação pode variar de poucos nanogramas a miligramas de substâncias/elementos/compostos por grama de bituca (Moerman & Potts, 2011; Pelit et al., 2013; Dobaradaram et al., 2017). Estudos têm demonstrado que os resíduos provenientes das bitucas de cigarro podem ser carreados para os ecossistemas naturais principalmente no período da estação chuvosa, sendo levados para cursos de água, lagos, poças temporárias e regiões costeiras, poluindo a água e o solo, podendo causar inúmeros prejuízos ao homem e à biota de um modo geral (Green et al., 2014; Wright et al., 2015).

Alguns estudos laboratoriais já demonstraram o potencial toxicológico dessas bitucas em diferentes modelos experimentais (Tabela 1) a exemplo do estudo de Slaughter et al. (2011), os quais demonstraram alta mortalidade de *Atherinops affinis* e *Pimephales promelas* quando expostos a água contendo bituca de cigarro (1 bituca/L). Além disso, já foi relatada toxicidade embrionária e alterações comportamentais em peixes (Lee & Lee, 2015), atividade antioxidante e peroxidação lipídica (Osuala et al., 2017) (dados apresentados na Tabela 1).

Estudos de campo envolvendo aves, avaliaram o uso de bitucas como repelente de ectoparasitas em seus ninhos. Em curto prazo os compostos presentes nas bitucas são benéficos às proles de *Passer domesticus* e *Carpodacus mexicanus* em longo prazo estes compostos são potenciais mutagênicos (Suárez-Rodríguez et al., 2012; Suárez & Macías, 2014). Parker & Rayburn (2017) ao exporem larvas de *Xenopus laevis* a lixiviado de cigarros fumados, observaram malformações (intestino, face e notocorda), edemas (coração, intestino, face cranial), anormalidades na cauda e alta mortalidade (Parke & Rayburn, 2017). Em um outro estudo também envolvendo anfíbio, Lawal & Ologundudu (2017), avaliaram a toxicidade das bitucas de cigarros fumados em *Hymenichirus curtipes*. Os autores acreditam que os efeitos oriundos destas bitucas esteja ligado às altas concentrações de metais pesados (Cd, Cu, Pb, Cr) identificados no lixiviado testado.

**Tabela 1. Tabela 1.** Levantamento de dados secundários de diferentes modelos experimentais de vertebrados e invertebrados expostos a lixiviado de bitucas de cigarro.

| Modelo e espécie   | Tipo de exposição                            | Diluição e/ou concentração  | Período de exposição  | Principais resultados  | Autores                   |
|--|--|---|-----------------------|--|---------------------------|
| Peixes: <i>Atherinops affinis</i> e <i>Pimephales promelas</i> . | Lixiviado de bitucas de cigarros.            | Foram utilizadas 3 diluições: concentrações de cigarro fumado (filtro + tabaco): 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 bitucas de cigarro/L.<br>2) filtro de cigarro fumado (sem tabaco): 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 bitucas de cigarro/L.<br>3) filtro de cigarro não fumado (sem tabaco): 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 bitucas de cigarro/L. | 96 horas              | CL50 foi de uma bituca de cigarro/L para o filtro fumado + tabaco.<br><br>O lixiviado de filtros de cigarros fumados (sem tabaco) apresentou menor toxicidade, CL50 de 1,8 e 4,3 pontas de cigarro/L.<br><br>Filtros de cigarro não-fumados (sem tabaco) toxicidade da CL50 de 5,1 e 13,5 pontas de cigarro/L. | Slought et al. (2011)     |
| Peixe: <i>Clarias gariepinus</i>                                 | Lixiviado do filtro das bitucas de cigarros. | Foi utilizado 10 g/L de filtros de bitucas de   | 24, 48, 72 e 96 horas | As taxas de mortalidade aumentaram com a   | Lawal & Ologundudu (2013) |

---

|                                 |                    |    |  |   |
|---------------------------------|--------------------|----|--|---|
|                                 |                    |    | <p>cigarros fumados e não fumados.</p> <p>1) Filtro fumado: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% da solução estoque.</p> <p>2) Filtro não fumado: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% da solução estoque.</p>   | <p>concentração e tempo de exposição.</p> <p>A CL50 de <i>C. gariepinus</i> ao filtro fumado foi sies vezes maiores que o não fumado após 24 horas.</p>   |
| Peixe: <i>Oryzias latipes</i> . | Lixiviado cigarro. | de | <p>1) tabaco fumado (TF): 16 bitucas de tabaco de 1 cm com filtro.</p> <p>2) tabaco não fumado (TNF): 16 bitucas de tabaco de 1 cm do filtro de cigarros.</p> <p>3) filtro não-fumado (FNF): 16 filtros de cigarros frescos (sem tabaco);</p> <p>4) filtro fumado (FF): 16 filtros (sem tabaco).</p> | <p>3 dias pós-fertilização.</p> <p>As diluições mais baixas concentações dos lixiviados de TF, TNF, e FF aumentou a taxa de batimentos cardíacos, desenvolvimento acelerado, alteração comportamental (aumento no nível de ansiedade), enquanto concentações elevadas reduziu a frequência cardíaca, o desenvolvimento, e aumento da mortalidade.</p> <p>Lee &amp; Lee (2015)</p> |

---

---

|  |                    |    |  |                     |  |
|--|--------------------|----|--|---------------------|--|
|  |                    |    | Ambos os grupos apresentaram as seguintes diluições: 0,2; 2; 5 e 10 bitucas/L.     |                     |  |
| Peixe:<br><i>Oreochromis niloticus</i> . | Lixiviado cigarro. | de | Foi utilizado duas marcas de cigarros (cigarros fumados (CF) e não fumados (NF)):  | 96 horas e 28 dias. | Diminuição da atividade hepática das brânquias em relação ao grupo controle Osuala et al. (2017) |
|  |                    |    | 1) Marca 1, bitucas (CF): 1,0; 1,5; 2,0; 3; 3,5 e 5 bitucas/L.                     |                     |  |
|  |                    |    | 2) Marca 2, bitucas (CF) de cigarros fumados: 1,0; 1,5; 2,0; 3; 3,5 e 5 bitucas/L. |                     |  |
|  |                    |    | 3) Marca 1, bitucas (NF): 2,5; 4; 8; 10; 12,5; 15 bitucas/L.                       |                     |  |
|  |                    |    | 4) Marca 2, bitucas (NF): 3; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 bitucas/L.                       |                     |  |

---

|  |   |   |   |  |  |
|--|---|---|---|--|--|
| <p>Aves: <i>Passer domesticus</i> e <i>Carpodacus mexicanus</i>.</p> | <p>Bitucas.</p>                                     | <p>Estudo de campo que identificou a presença de bitucas de cigarros nos ninhos de aves urbanas.</p>        | <p>Temporada de desova de 2011.</p>   | <p>Bitucas de cigarro fumadas funcionam como repelentes de parasitas em ninhos de aves urbanos.</p>                                    | <p>Suárez-Rodríguez &amp; Rarcia, (2012)</p> |
| <p>Ave: <i>Carpodacus mexicanus</i>.</p>                             | <p>Bitucas.</p>                                     | <p>Estudo de campo que também identificou a presença de bitucas de cigarros nos ninhos de aves urbanas.</p> | <p>Para o teste de micronúcleo o sangue das proles foram coletadas com 8 dias de eclosão.</p> | <p>O sucesso da eclosão e do filhote e sua resposta imune foram correlacionados positivamente com a proporção de bitucas no ninho.</p> | <p>Suárez-Rodríguez &amp; Garcia (2014)</p>  |
| <p>Anfíbio: <i>Hymenochirus curtipes</i></p>                         | <p>Lixiviado do filtro das bitucas de cigarros.</p> | <p>Foi utilizado 10 g/L de filtro de bitucas de cigarro fumados e não fumados.</p>                          | <p>24, 48, 72 e 96 horas.</p>   | <p>As taxas de mortalidade aumentaram com o tempo de exposição.</p>  | <p>Lawal &amp; Ologundudu (2013)</p>         |

---

|                                |  |  |   |   |   |
|--------------------------------|--|--|---|---|---|
|                                |  |  | <p>1) Filtro fumado: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% da solução estoque.</p> <p>2) Filtro não fumado: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% da solução estoque.</p> |   | <p>A resposta letal de <i>H. curtipes</i> ao filtro fumado foi sies vezes maiores que o não fumado após 24 horas.</p> |
| Anfíbio: <i>Xenopus laevis</i> | Lixiviado do filtro das bitucas de cigarros. | Foram expostos a cigarro tradicional (CT), cigarro de menta (M) e ao cigarro eletrônico (CE) em concentrações variando de 0 a 4 pontas / 1 para CM e 0-10 pontas / 1 para CE.                  | 96 horas.   | Malformação (cabeça, intestino e calda) e desenvolvimento embrionário tardio.   | Parker & Rayburn (2017)   |
| Mamífero: <i>Mus musculus</i>  | Lixiviado de bitucas de cigarro              | <p>Lixiviado de bitucas de cigarros fumados com e sem tabaco.</p> <p>1) 40 bitucas/L de água</p> <p>2) 80 bitucas/L de água</p> <p>3)120 bitucas/L de água</p> <p>4) 160 bitucas/L de água</p> | 70 dias   | <p>Neste estudo os autores observaram que o lixiviado ofertado na água afetou o consumo de ração de camundongos machos de Swiss, ocasionou malformações no tecidos hepáticos, renais, cardíacos e pulmonares, além da</p> | Bekele (2016)   |

---

|  |            |                                      |    |   |  |   |                        |
|--|------------|--------------------------------------|----|---|--|---|------------------------|
|  |            |                                      |    | 5) 75 bitucas com tabaco em 250 mL de água  |  | biomassa corpórea dos animais.  |                        |
| Mamífero:<br><i>Mus musculus</i>               | <i>Mus</i> | Lixiviado bitucas                    | de | Lixiviado de bitucas de cigarros fumados.<br><br>1) 24 µg/L de lixiviado de cigarro<br><br>2) 24 mL/L de lixiviado de cigarro.  | 60 dias  | camundongos cronicamente expostos à água contaminada com o lixiviado (na concentração ambiental) apresentavam déficit em sua resposta defensiva a potenciais predadores (gato e cobra).                   | Cardoso et al (2018)   |
| Cladóceros:<br><i>Daphnia magna</i> .          |            | Lixiviado bitucas.                   | de | 1) Filtro de cigarros fumados 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 bitucas/L.<br><br>2) Bitucas de cigarros fumadas 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 bitucas/L.<br><br>3) Filtro de cigarros não fumados 16; 8; 4; 2; 1 e 0,5; bitucas/L. | 48 horas   | Os resultados indicam que os produtos químicos liberados em ambientes de água doce a partir de pontas de cigarro são letais para a <i>D. magna</i> em concentrações de 0,125 pontas de cigarro por litro. | Register (2000)        |
| Cladóceros:<br><i>Ceriodaphnia cf. dubia</i> . |            | Lixiviado bitucas de cigarro fumado. | de | Quatro bitucas referentes à 6 marcas foram adicionas em um litro de água por 24 horas. Em   | 48 horas para <i>C. cf. dubia</i> e 30 min para <i>V. fischeri</i> . | Para <i>C. cf. dubia</i> (48 horas foi observado a imobilização em ambos os grupos.   | Micevska et al. (2006) |

|  |                              |  |                                      |    |  |
|--|------------------------------|--|--------------------------------------|----|--|
| Bactéria: <i>Vibrio fischeri</i> .                     |                              | seguida, foram estabelecidos 6 grupos, os quais continham as seguintes diluições: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80% de lixiviado de bitucas de cigarro fumado. |                                      |    | Para <i>V. fischeri</i> (30-min EC50 perda da bioluminescência.<br><br>O cladóceros <i>C. cf. dubia</i> foi mais sensível do que a bactéria <i>V. fischeri</i> .   |
| Verme marinho: <i>Hediste diversicolor</i>             | Lixiviado de cigarro fumado. | Foram utilizados as seguintes concentrações: 8, 4, 2, 1 e 0,5 filtros de cigarros L <sup>-1</sup> .  | Duas exposições: 96 horas e 28 dias. |    | Os animais expostos ao lixiviado de cigarro em água do mar em concentrações 60 vezes menores do que os relatados para o escoamento urbano exibiram tempos de escavação significativamente maiores > 30% de perda de peso e > 2 vezes mais danos no DNA quando comparados ao grupo controle. Wright et al. (2015) |
| Moluscos: <i>Austrocochlea porcata</i> , <i>Nerita</i> | Lixiviado de cigarro fumado. | Molusco: <i>Anguispira alternata</i>   | Lixiviado de bituca                  | de | Preparou-se uma solução estoque de lixiviado de bitucas de Gill et al. (2018)  |

---

*atramentosa* e  
*Bembicium nanum*

cigarro  
fumado.

cigarro colocando 8  
bitucas em 2 litros de  
água destilada  
desionizada por 2 dias.

A solução estoque foi  
diluída em série com  
água desionizada: 4; 2;  
1; 0,5 e 0,25 bitucas/L.

---

---

Nos mamíferos até o momento foram realizados dois estudos. O primeiro avaliou os efeitos causados pela ingestão de água contendo bitucas de cigarro fumados. Os Swiss machos foram expostos por 70 dias e observou a redução na ingestão de alimentos, mudança na massa de diferentes órgãos (fígado, pulmão, baço coração, rim e gordura epididimal), e alterações pulmonares, semelhantes ao enfisema pulmonar (Bekele, 2016). No segundo trabalho os autores expuseram fêmeas de camundongos Swiss durante 60 dias a ingestão de água contendo lixiviado de cigarro diluído. Os tratamentos não causaram alterações na locomoção, visão, audição e olfato dos animais. No entanto, os animais tratados com lixiviado não souberam diferenciar a cobra falsa da verdadeira quando expostos a elas, demonstrando déficit responsivo a potencial predador. Assim, esses dados demonstram o potencial neurotóxico do lixiviado de cigarro, mesmo diluído em água (Cardoso et al., 2018).

Em relação aos invertebrados, Micevska et al. (2006) avaliou a toxicidade aguda do lixiviado de 19 tipos de cigarros em *Ceriodaphnia cf. dubia* (48 horas de CE<sub>50</sub> causou imobilização), e a proteobacteria *Vibrio fischeri* (30 minutos de CE<sub>50</sub> afeta sua bioluminescência). Neste estudo foi observado que os compostos orgânicos presentes no lixiviado causam a maior parte da toxicidade, especialmente a nicotina e o etilfenol Register (2000) relatou que os lixiviados de filtros de cigarro fumado são tóxicos (isto é, 48 horas CE<sub>50</sub>) para *Daphnia magna*, com concentrações variando entre uma e duas bitucas por litro de água (Tabela 1) (Register, 2000). No experimento conduzido por Wright et al. (2015) foram avaliados os impactos de substâncias tóxicas e microfibras presentes no filtro de cigarro fumado no verme poliqueta *Hydista diversicolor* (verme marinho presente em regiões costeiras), quando exposto ao lixiviado. Os animais expostos apresentaram perda de peso, dano no material genético quando comparado ao grupo controle, maior taxa de escavação. Porém, quando os animais foram expostos ao filtro isoladamente não houve diferença significativa entre os grupos (Wright et al., 2015).

Outro grupo também exposto ao lixiviado de bitucas de cigarros fumados foram os moluscos. Recentemente Gil et al. (2018) introduziram os caramujos terrestres *Anguispira alternata* em aquários com diferentes densidades de bitucas de cigarro [de 0 a 4 bitucas (0 a 0,92 bitucas/kg de solo) durante 32 dias]. Ao fim de experimento não houve diferença estatística entre alimentação, crescimento e sobrevivência dos animais. Os autores observaram apenas aversão às bitucas durante a primeira semana de avaliação. Essa aversão por um curto período de tempo pode indicar uma diminuição da toxicidade das bitucas dispostas no solo à medida que envelhecem (Gill et al., 2018).

Booth et al. (2015) realizaram experimento em laboratório envolvendo três espécies de moluscos: *Austrocochlea porcata*, *Nerita atramentosa* e *Bembicium nanum*. Quando expostos por 8 dias nas diluições de 5 bitucas/L, os autores observaram 100% de mortalidade para as 3 espécies. Já quando expostos a outras diluições (tabela 1), os animais apresentavam aversão ao lixiviado, saindo da água e indo em direção às bordas do aquário. Com os resultados obtidos os autores concluíram que os compostos presentes no lixiviado afetam o comportamento de alimentação bem como sua capacidade de se movimentar em resposta ao estresse fisiológico provocado pelo lixiviado (Booth et al., 2015). Embora esses estudos sejam importantes para identificar os possíveis efeitos nocivos do lixiviado em diferentes grupos de metazoa, as concentrações e/ou diluições podem não representar o que de fato ocorre no ambiente natural, necessitando assim do desenvolvimento de novos estudos e de diluições que se aproximem ao máximo das condições e concentrações ambientais dos compostos presentes no lixiviado de cigarros fumados.

Os estudos anteriores que expuseram moluscos são de suma importância, pois foram os primeiros a exporem os animais aos compostos presentes no cigarro (solo e água). No entanto, ainda existem inúmeras lacunas que devem ser preenchidas em relação ao potencial (eco)toxicológico das bitucas de cigarro em populações de moluscos. Logo, visando compreender e identificar os impactos que esse poluente de alta complexidade pode causar na biota aquática, foram avaliados neste trabalho os efeitos da exposição do molusco bivalve *Anodontites trapesialis* a água contaminada com diluições do lixiviado de bitucas de cigarros fumadas que se aproximam de uma condição ambiental (isto é, ecologicamente relevantes). Para isso utilizamos biomarcadores comportamentais, imunológicos e mutagênicos, partindo da hipótese de que os compostos presentes no lixiviado (orgânicos-inorgânicos) pode impactar a sobrevivência desses animais causando anormalidade eritrocitárias nucleares, alterações imunes e déficits comportamentais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Modelo experimental**

No presente estudo foram utilizados indivíduos de *A. trapesialis*. Programas de bimonitoramento ambiental tem utilizado com sucesso os bivalves residentes (ambiente natural) ou transplantados (laboratório) para avaliação de uma variedade de poluentes industriais, resíduos de mineração, esgotos urbanos, metais, pesticidas organoclorados, se tornando um excelente modelo para este estudo (Lopes et al., 1992; Salazar & Salazar

1995; Salazar, 1997; Calill & Junk, 1999; Jacomini, 2002; Tomazelli et al., 2003; Jacomini et al., 2006; Loayza-Muro Elías-Letts, 2007; Oliveira et al., 2015; Oliveira et al., 2018).

Os indivíduos foram capturados (tocando o substrato com os pés e quando identificados foram retirados cuidadosamente com as mãos) em um tanque de piscicultura localizado nas dependências do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Urutaí – Goiás, em sedimento de fundo a uma profundidade de 0,5 a 1,5 m da superfície. Após a captura, os animais foram colocados em caixas de polipropileno, contendo água da piscicultura e transportados para o Laboratório de Pesquisas Biológicas do referido Campus, não tendo havido registro de morte dos animais durante o transporte.

Ao chegarem ao laboratório os animais foram habituados por 14 dias [aclimatação e depuração (Rigonato et al., 2005; Oliveira et al., 2016)] em caixas de polietileno contendo água desclorada (renovada a cada 36 horas) sob fotoperíodo 12/12h (~21°C), pH (6,5–7,5) e oxigenação constante, adaptado de Oliveira et al. (2018). A água desclorada foi obtida por evaporação por aeração 48 h antes da utilização. Durante a aclimatação os moluscos foram alimentados com células maceradas desidratadas de *Spirulina platensis* (~10.000 células mL<sup>-1</sup>) a cada dois dias, de acordo com a metodologia empregada por Loayza-Muro Elías-Letts (2007).

## **2.2. Design experimental**

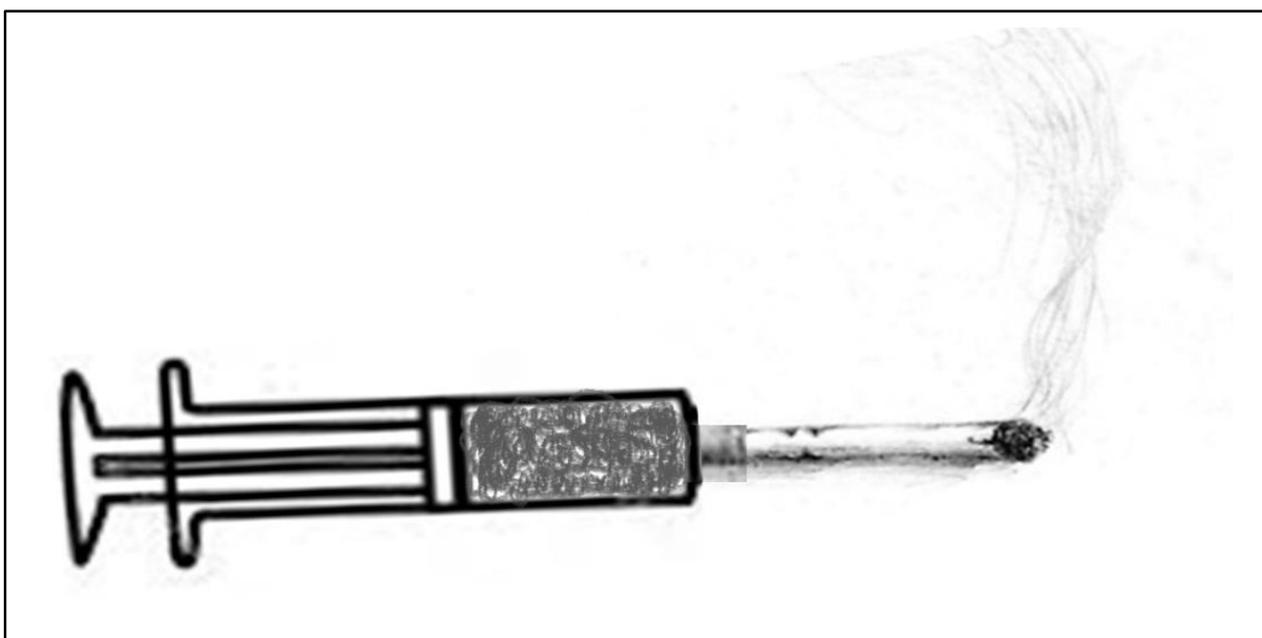
Logo após o período de aclimatação os animais foram contrabalanceados a partir da co-variável biomassa corpórea, de modo que a média da biomassa inicial dos bivalves foi estatisticamente igual entre os grupos. Após isso, os bivalves foram distribuídos em três aquários (dimensões: 85 cm de comprimento x 40 cm de largura x 40 cm de altura) providos de 11 cm com uma mistura de areia média e fina, e 60 L de água [metodologia adaptada de Cândido & Romero (2006), contendo 22 animais por aquário (154,5 cm<sup>2</sup>/animal) sobre oxigenação constante. Em seguida, os bivalves foram mantidos em uma sala experimental com controle de temperatura (22 a 25°C) e luminosidade (12 horas de ciclo claro/escuro), conforme a metodologia empregada por Oliveira et al. (2018).

Cada aquário constituiu um grupo experimental diferente, sendo que cada animal foi considerado uma réplica: (i) grupo controle, composto de animais expostos a água tratada desclorada sem qualquer tipo de poluente (0% de lixiviado de cigarro; n= 22); (ii) grupo concentração ambiental (CA) 1x: em que os animais receberam água contendo lixiviado de bitucas de cigarros fumados em quantidade correspondente à concentração

de nicotina identificada em águas superficiais por estudos prévios e (iii) grupo CA 10x: (n= 22), constituído por animais expostos a água contendo lixiviado de bitucas de cigarros fumados em quantidade 10 vezes superior àquela utilizada no grupo anterior. Em todos os grupos, a água e o substrato arenoso não foram renovados durante o período experimental de 14 dias. Esse cenário simula um ambiente lântico que recebeu um único input de poluentes.

### **2.3. Preparação do lixiviado de cigarro e determinação da diluição dos lixiviados de cigarro fumado**

A preparação da solução estoque foi baseada na metodologia adotada por Cardoso et al. (2018) (ou seja, relacionada à marca de cigarros usados). Um maço de cigarro, composto por 20 unidades (Derby Azul KS, Souza Crus S/A, Rio de Janeiro, Brasil), foi adquirido em comércio local. A marca e o tipo de cigarro foram escolhidos com base na sua alta popularidade no Brasil (Cardoso et al., 2018). Em seguida, os cigarros foram fumados artificialmente (vide dispositivo ilustrado abaixo – Figura 1), todos no mesmo dia, tendo sido o tamanho das pontas de cigarro padronizado (1 cm de comprimento). Em seguida, as bitucas de cigarro foram transferidas para um béquer contendo 1 L de água potável. A solução foi deixada descansar por 24 horas e, após esse período, foi filtrada e armazenada a -20°C até a condução das diluições.



**Figura 1.** Imagem ilustrativa do aparato utilizado para fumar os cigarros artificialmente.

A quantidade de lixiviado a ser utilizado nas águas de exposição foi definida a partir da simulação de uma condição realista em que bitucas de cigarro em um pequeno curso d'água de baixo fluxo são encontradas (Figura 1), oriunda do descarte inadequado. No cenário exemplificado abaixo identificamos 11 bitucas [nicotina: 2,13 mg/bituca, segundo Green et al., 2014] em um poço (Corrego Palmital – Urutaí – Goiás (17°29'12.60"S 48°12'37.25"O)) cujo volume foi estimado em 480 L. Logo, reproduzimos a mesma condição proporcional ao volume dos aquários utilizados para a exposição dos animais, cujo volume de água era de 60 L. Assim, os animais do grupo CA1x foram expostos a água contendo lixiviado de cigarro fumado correspondente a 1,375 bitucas de cigarro (2,9 mg de nicotina) (CA1x) e à 10 vezes superior à CA (29 mg/L de nicotina) (CA10x).



**Figura 2.** Foto do Córrego Palmital onde foram encontrados bitucas de cigarros fumados descartados de forma irregular.

#### **2.4. Caracterização química do lixiviado**

A caracterização físico-química e química da água utilizada no experimento foi conduzida de acordo com as recomendações metodológicas da *American Public Health Association* (APHA) (APHA, 1997). Já para a caracterização orgânica, adotamos a técnica de espectrometria de massa com ionização por electrospray. Nesse caso, amostras

de solução estoque foram inicialmente diluídas em metanol (1: 1 v/v) até atingir 1 mL. Posteriormente, adicionamos 0,1% (v/v) de ácido fórmico (HCOOH; sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) à solução para realizar as análises de modo positivo. Hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>O; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (0,1% v/v) foi adicionado às amostras visando realizar análise de modo negativo.

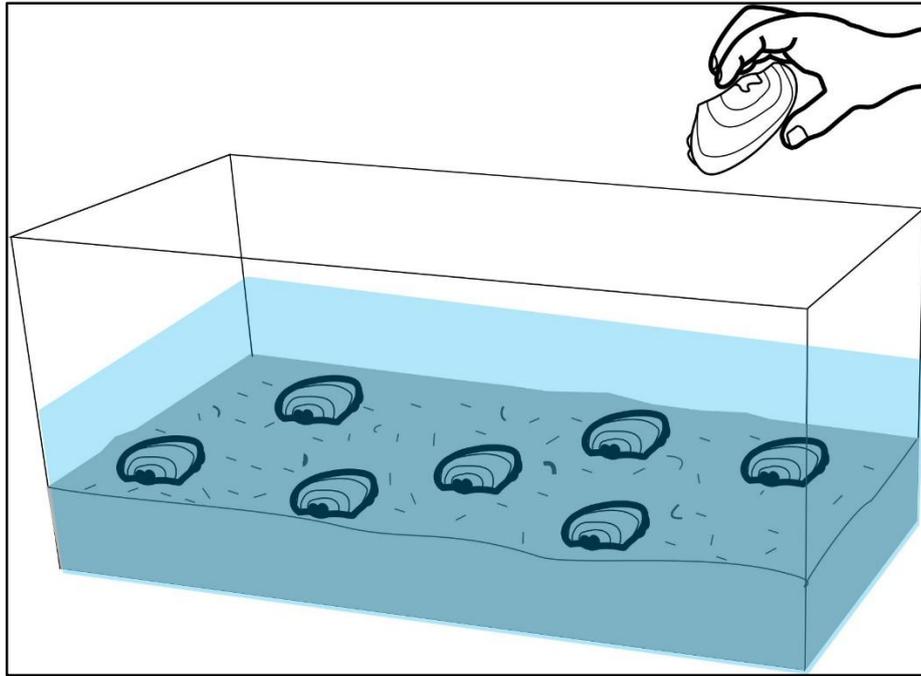
As soluções resultantes foram imediatamente injetadas nas fontes de ionização por electrospray (ESI) a um fluxo de 5 µL/min. As análises foram realizadas no Espectrômetro de Massa Q Exactive™ Quadruplo-Orbitrap Híbrido (Bremen, Alemanha) na solução 140.000, faixa de massa 150-1000 *m/z*, tensão de pulverização 4,0 KV, tempo máximo de injeção 4,0 KV, temperatura capilar 275 °C Nível de RF da Lente S 50%. As fórmulas moleculares foram geradas no pacote de software Xcalibur Analysis (Versão 2.0, Service Release 2, Thermo Electron Corporation), sendo aceitas apenas quando as diferenças médias entre a massa teórica e experimental foram inferiores a 1,0 ppm. Os seguintes isotopólogos foram utilizados para analisar as diferenças: <sup>12</sup>C, <sup>1</sup>H, <sup>16</sup>O, <sup>14</sup>N, <sup>23</sup>Na e <sup>39</sup>K.

## **2.5. Testes comportamentais**

Considerando a hipótese de que a água contaminada com o lixiviado de cigarro poderia alterar o comportamento dos bivalves, estes foram submetidos aos testes detalhados a seguir.

### **2.5.1. Resposta antipredatória simulada**

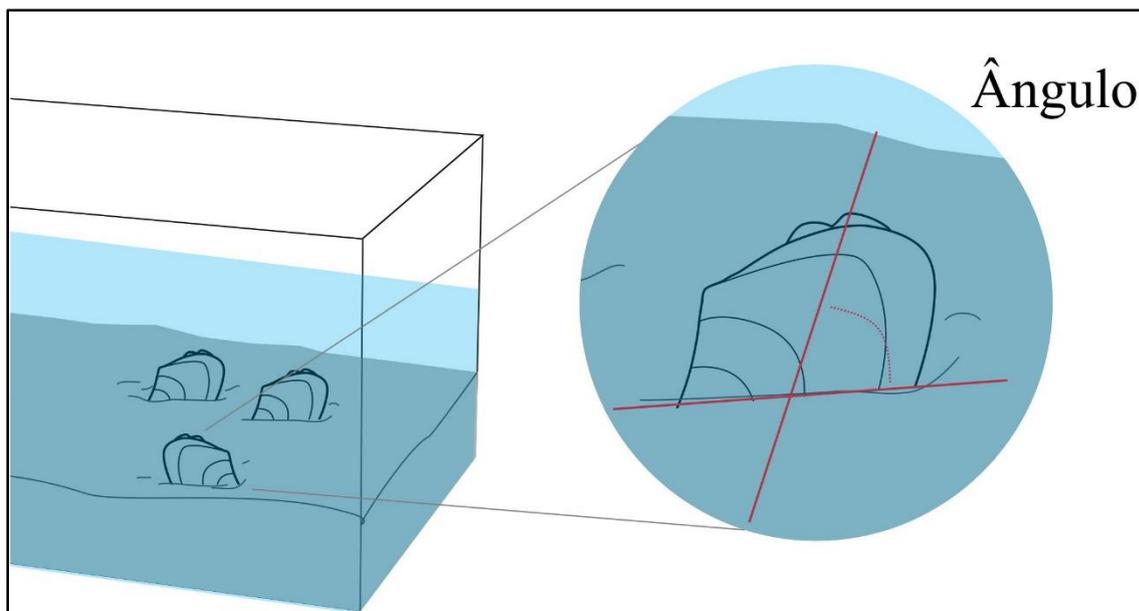
Neste teste buscamos simular a captura dos bivalves por um predador externo ao ambiente aquático e, posteriormente, uma soltura acidental. Assim, todos os animais que se encontravam enterrados foram retirados dos substratos cuidadosamente por uma única pessoa, erguidos a uma altura de 30 cm da lâmina d'água e, depois de 10 segundos fora d'água, foram soltos dentro do aquário (Figura 3). Posteriormente, os animais foram filmados por 7 horas consecutivas.



**Figura 3.** Imagem representativa do teste de resposta antipredatória simulada.

### **2.5.2. Ângulo de enterramento**

No ambiente natural, os riscos de predação dos bivalves podem ser mais ou menos intensos, conforme a variação do seu ângulo de inclinação. Animais com ângulos ( $0 < \theta < 80^\circ$ ) diminui seu centro de gravidade em relação ao substrato e, conseqüentemente, possui risco aumentado de predação, exposição a luz solar e de serem levados pelo fluxo d'água (Sassa et al., 2011). Portanto, ao final do experimento foi mensurado o ângulo de inclinação de cada animal, conforme representado pela. Tal medida foi realizada utilizando recomendações metodológicas empregada por Sassa et al., (2011), utilizando um transferidor e uma régua para medir o ângulo de inclinação dos animais conforme ilustrado na figura 4.

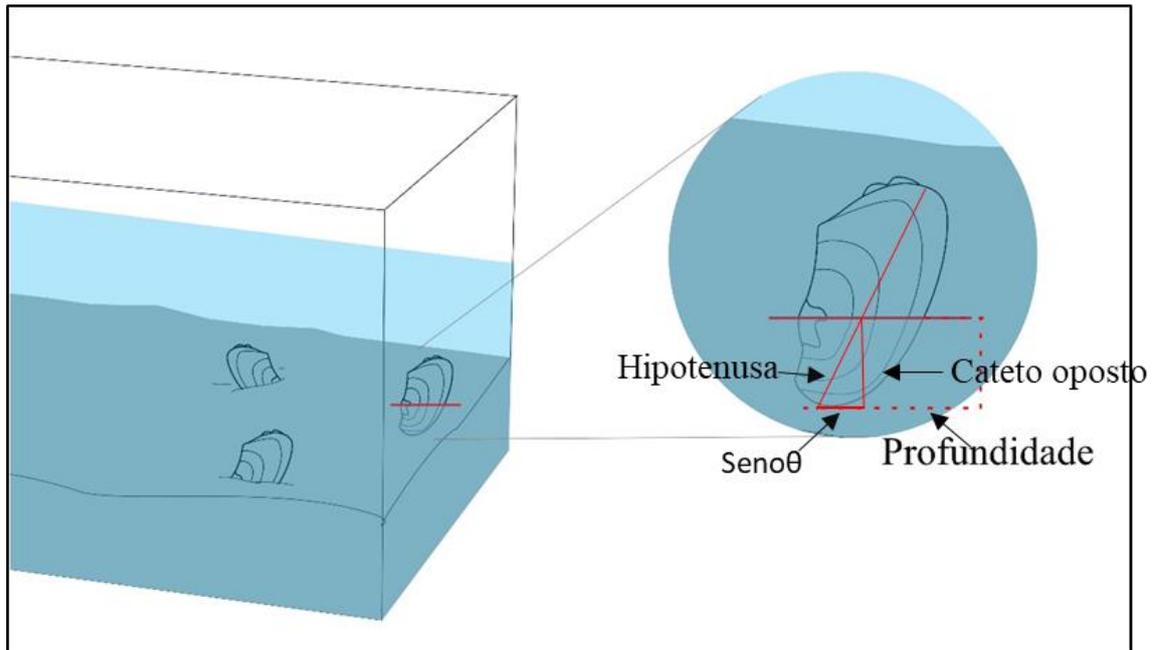


**Figura 4.** Imagem representativa do ângulo de inclinação dos bivalves quando o mesmo se encontrava enterrado.

### **2.5.3. Profundidade de enterramento**

Partindo da hipótese de que os bivalves responderiam ao ataque simulado de um predador, registramos a profundidade de enterramento (Figura 5) após 7 horas da soltura do animal no aquário. O enterramento do animal no substrato representaria, assim, uma resposta de fuga à situação adversa imposta a ele.

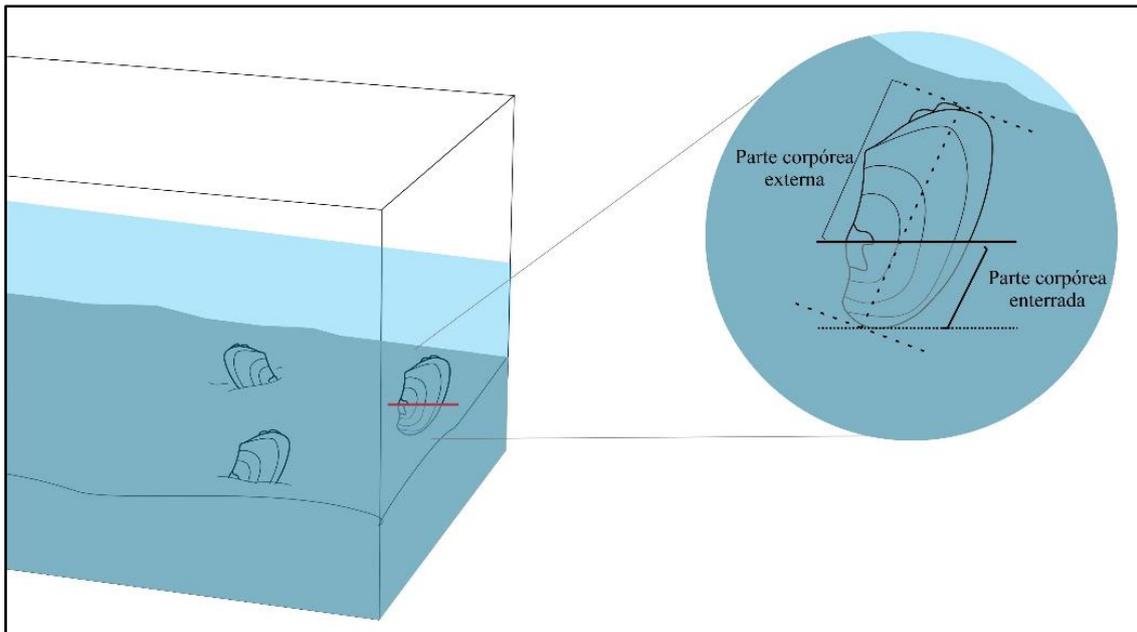
Para aferir a profundidade de enterramento foi utilizado uma régua para medir quanto o animal estava exposto. A profundidade de enterramento foi aferida, aplicando-se a seguinte fórmula:  $\text{seno do ângulo} = \text{cateto oposto} / \text{hipotenusa}$  do triângulo, onde o cateto oposto corresponde à profundidade de enterramento do animal. Já a hipotenusa corresponde ao comprimento da parte do animal enterrado, isto é, o comprimento total subtraído do comprimento da parte externa.



**Figura 5.** Imagem ilustrativa da profundidade de enterramento, linha contínua vermelha representa o substrato areia, linha pontilhada representa parte do animal que se encontra enterrado no substrato.

#### 2.5.4. Percentual de exposição corpórea

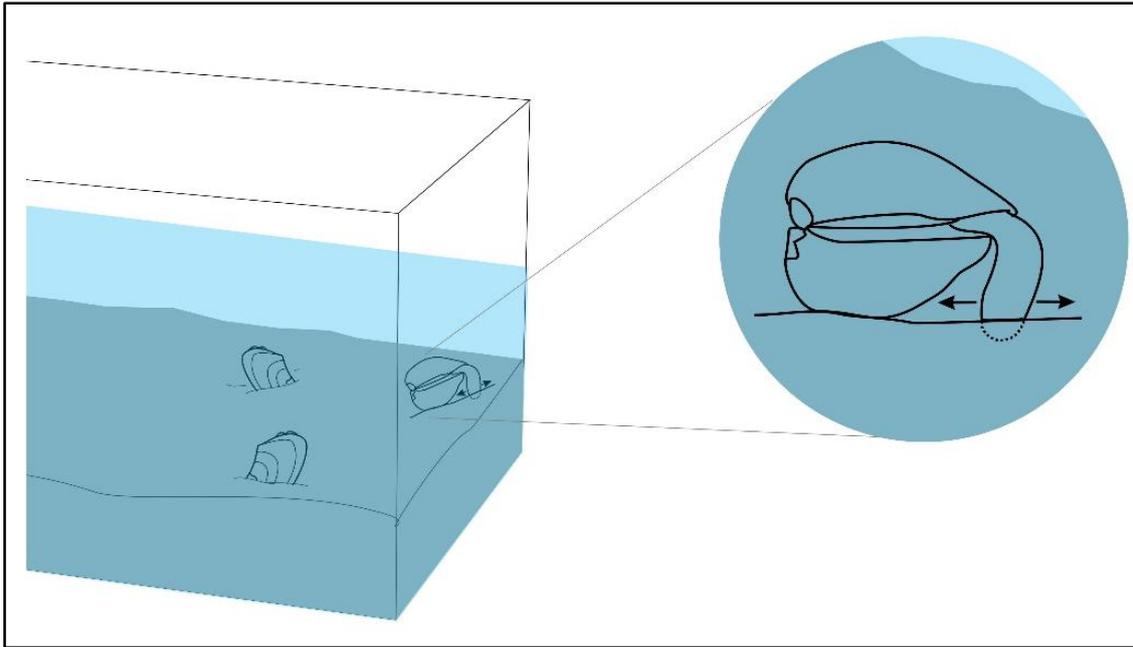
Foram estimados o percentual de exposição corporal externa dos bivalves (Figura 6), após 7h de filmagens. Para isso utilizamos os seguintes parâmetros: comprimento total (CT); comprimento fora do substrato (CS), multiplicado por 100 (Exposição corpórea =  $(CT/CS*100)$ ), o fator de multiplicação de 100 foi usado para que os indivíduos mais lentos tivessem valores acima de 1,0.



**Figura 6.** Imagem ilustrativa do percentual de exposição corpórea durante 7 h de filmagens, após receber uma tentativa de predação simulada. Linha pontilhada delimita o corpo do animal, linha contínua divide a parte enterrada da parte externa exposta.

### 2.5.5. Latência para emissão do pé

Para escavação do bivalve *A. trapesialis* foram distinguidas três fases no seu processo de escavação: fase I (penetração do pé no substrato), fase II (levantamento do casco) e fase III (aprofundamento da casca no substrato) (Figura 7). Para análise da latência de emissão do pé (Figura 7), foi registrado o tempo que o bivalve levava para emitir o pé pela primeira vez, ou seja, o primeiro movimento que antecede o início da escavação. Nesse movimento o animal abre sua concha e expande o seu pé, podendo ou não tocar o substrato.



**Figura 7.** Imagem ilustrativa, tempo gasto para que o bivalve *A. trapesialis* contraísse o pé.

#### **2.5.6. Latência para começar a escavar**

Nós também estimamos o tempo gasto pelo animal até a primeira tentativa de escavação, proporcional à duração do teste. Assim, foi calculada a razão entre o tempo para iniciar a escavação (s) e a duração da filmagem (7 horas).

#### **2.5.7. Índice de enterramento**

Para calcular o índice de escavação adotamos a equação proposta por Alexander et al. (1993) e modificada por Candido & Romero (2007):  $ITE = [massa\ da\ amostra\ (g)^{0,33} / \text{tempos}\ (s)\ de\ escavação] \times 10^4$ . A massa de cada espécime foi medida com uma aproximação de 0,1g. Um fator de multiplicação de 10000 foi usado para que os indivíduos mais lentos tivessem índice igual ou superior a 1,0.

### **2.6. Coleta e contagem diferencial de hemócitos**

Partindo da hipótese de que a exposição dos animais ao lixiviado de cigarro também pudesse alterar parâmetros imunológicos, nós realizamos a contagem diferencial de hemócitos dos moluscos. Para isso, foi injetado no músculo abductor esquerdo dos animais uma solução salina para posteriormente coletarmos a hemolinfa, conforme realizado por Lassudrie et al. (2014) e Campos et al. (2015). Após isso, foram realizados esfregaços em duas lâminas por animal, as quais foram secas e, posteriormente, fixadas

em álcool metílico a 100%(v/v) 10 minutos e coradas com Panótico Rápido® (New Pro). Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100) utilizando lente de imersão, conforme Rabelo et al. (2013). Foram contabilizados 200 hemócitos por lâmina, totalizando 400 células por bivalve (Rabelo et al., 2013). A classificação foi de acordo com suas características morfológicas, as quais incluíram células blastiformes (células menores cuja relação núcleo citoplasma é bem pequena), hialinócitos tipo I (células apresentam núcleo redondo central e levemente excêntrico), hialinócitos tipo II (caracterizado pelo núcleo excêntrico) e granulócitos (presença de grânulos) Donaghy et al. (2010).

## **2.7. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares**

O teste do micronúcleo (MN) é uma das técnicas mais utilizadas para detecção precoce de danos cromossômicos ao DNA, causados por agentes químicos e físicos (Baršienė et al., 2008; Siu et al., 2008). Os micronúcleos podem se originar de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros que não completam a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico). Essa técnica é bastante eficaz, provando de fato ser eficiente na detecção de danos genéticos nas espécies de bivalves expostos a diferentes compostos (Fedato et al., 2010). O teste de micronúcleo tem sido bastante utilizado em moluscos para o biomonitoramento de qualidade da água (Brunetti et al., 1992; Magni et al., 2006; Baršienė et al., 2008; Fedato et al. 2010).

A frequência MN para cada 2000 hemócitos (hialinócitos do tipo I e II) analisados foi determinada de acordo com os critérios de exame previamente relatados por Fench, 2007. Resumidamente, os critérios empregados para identificar os MN foram os seguintes: i) diâmetro do MN variando entre 1/16 e 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais; ii) MNs não refrativos - eles podem ser facilmente distinguidos de artefatos como partículas de coloração; iii) MNs não ligados ou conectados aos núcleos principais; iv) MN possivelmente tocando, mas não se sobrepondo, os núcleos principais - o limite micronuclear deve ser distinguido do limite nuclear; v) MN com a mesma intensidade de coloração que os núcleos principais, ou ocasionalmente, mais intensamente corados. A presença de outras anormalidades nucleares foi avaliada em quatro populações de hemócitos, conforme descritas por Donaghy et al. (2010).

## **2.8. Bioacumulação de metais**

Para a avaliação da possível ligação entre a acumulação dos metais Cr, Ni, Pb, Mn, Zn, Na, K (presentes em elevada concentração no lixiviado de cigarro) e as respostas comportamentais, amostras do tecido do músculo adutor dos animais foram coletadas para análise química desses elementos. A acumulação destes metais na musculatura se deve ao fato destes animais absorverem grandes quantidades suspensas em água e os acumularem no seu corpo, sendo uma das particularidades dos bivalves (Bolognesi & Fenech, 2012).

As concentrações destes metais foram quantificadas por absorção atômica, de acordo com o método proposto por Li et al. (2012), com algumas modificações. Resumidamente, o músculo abdutor foi digerido em um becker de rosca contendo 2 mL de solução de digestão húmida (ácido nítrico a 75 % (HNO<sub>3</sub>): 70 % de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) = 1: 1 v/v). Posteriormente, as amostras foram colocadas em uma placa aquecedora durante 4 h a 100 °C. Após a digestão das amostras, a tampa (vidro relógio) foi removida e o processo de aquecimento continuou a 80°C até a secagem total. Em seguida, adicionou-se 5% de HNO<sub>3</sub> para dissolver o resíduo da amostra, completando o volume final para 5 mL.

## **2.9. Análise estatística**

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido pelo teste de variância de homogeneidade de Levene. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à *one-way* ANOVA, com teste post hoc de Tukey, a 5% de probabilidade, nos casos de F significativos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste post hoc de Dunn's, a 5% de probabilidade. Todos os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 7.0).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

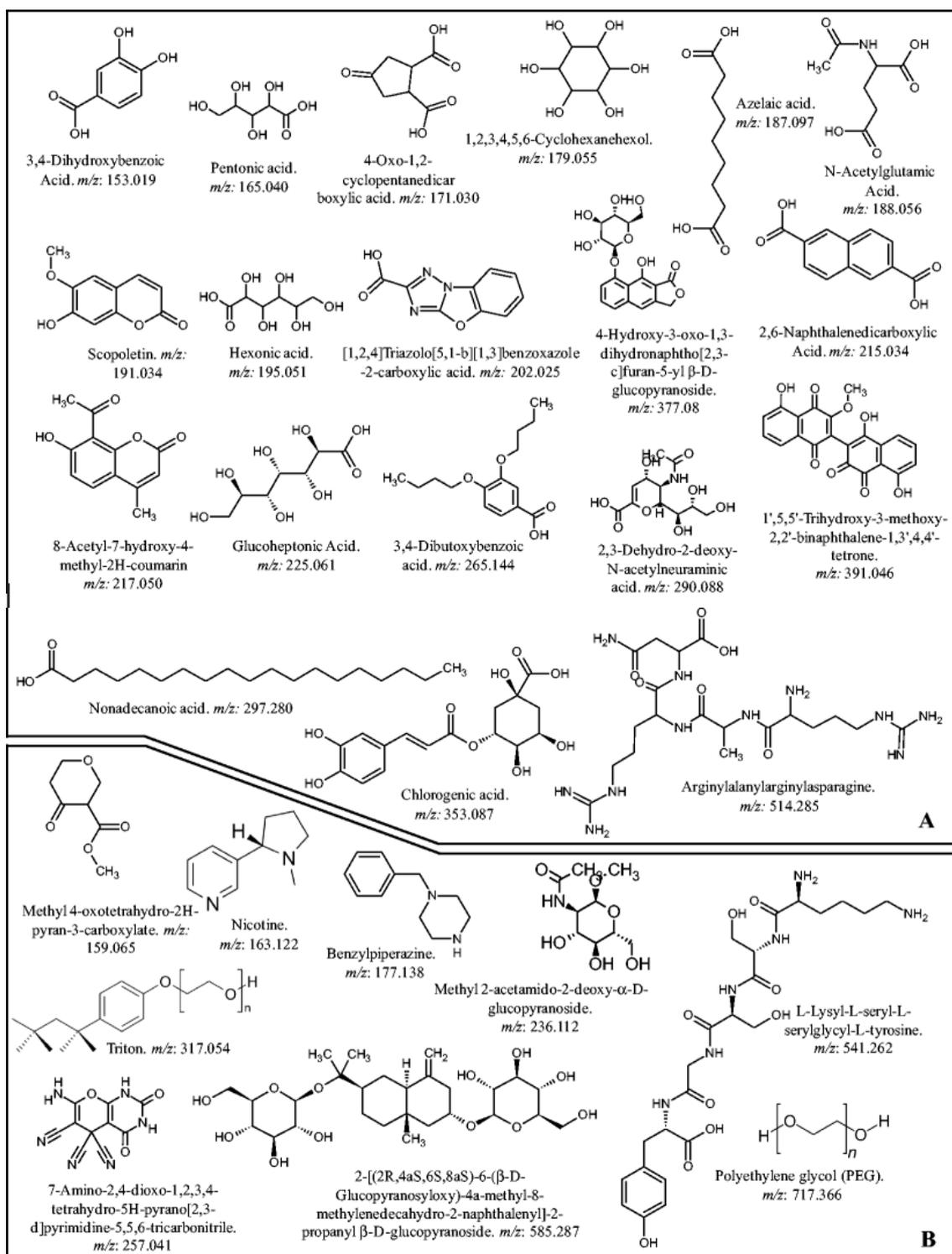
Todos os compostos detectados na caracterização físico-química da água e dos diferentes tratamentos utilizados no presente estudo são demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização química das águas utilizadas na exposição dos grupos controle, lixiviado 100% (Cardoso et al., 2018), concentração ambiental (CA1x) e concentração 10 vezes superior (CA10x).

| <b>Elementos químicos (mg/L)</b> | <b>Água</b> | <b>Lixiviado (100%)</b> | <b>CA1x</b> | <b>CA10x</b> |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|--------------|
| P                                | 0,400       | 7400,00                 | 0,408       | 0,477        |
| N                                | 0,000       | 10.400,00               | 0,011       | 0,114        |
| Na                               | 7,070       | 10.200,00               | 7,073       | 7,104        |
| As                               | NID         | NID                     | NID         | NID          |
| Cd                               | NID         | NID                     | NID         | NID          |
| Pb                               | 0,018       | 29.000                  | 0,018       | 0,018        |
| Cu                               | 0,037       | 67,00                   | 0,037       | 0,037        |
| Fe                               | 0,300       | 410,00                  | 0,300       | 0,301        |
| Mn                               | 0,011       | 290,00                  | 0,011       | 0,014        |
| Ni                               | 0,013       | 23.000                  | 0,013       | 0,013        |
| Zn                               | NID         | 67,00                   | NID         | 0,001        |
| K                                | 2,440       | 142.000,00              | 2,594       | 3,975        |
| Al                               | 0,120       | 10,00                   | 0,120       | 0,119        |
| Mg                               | 1,520       | 15.200,0                | 1,535       | 1,670        |
| Co                               | 0,020       | 28,00                   | 0,020       | 0,020        |
| Cr                               | NID         | 0,25                    | NID         | 0,003        |
| Ba                               | NID         | 3,81                    | 0,004       | 0,042        |
| Sr                               | NID         | 9,89                    | 0,011       | 0,109        |
| Ti                               | NID         | 0,646                   | 0,001       | 0,007        |

NID: Não identificado ou abaixo do limite de quantificação da técnica.

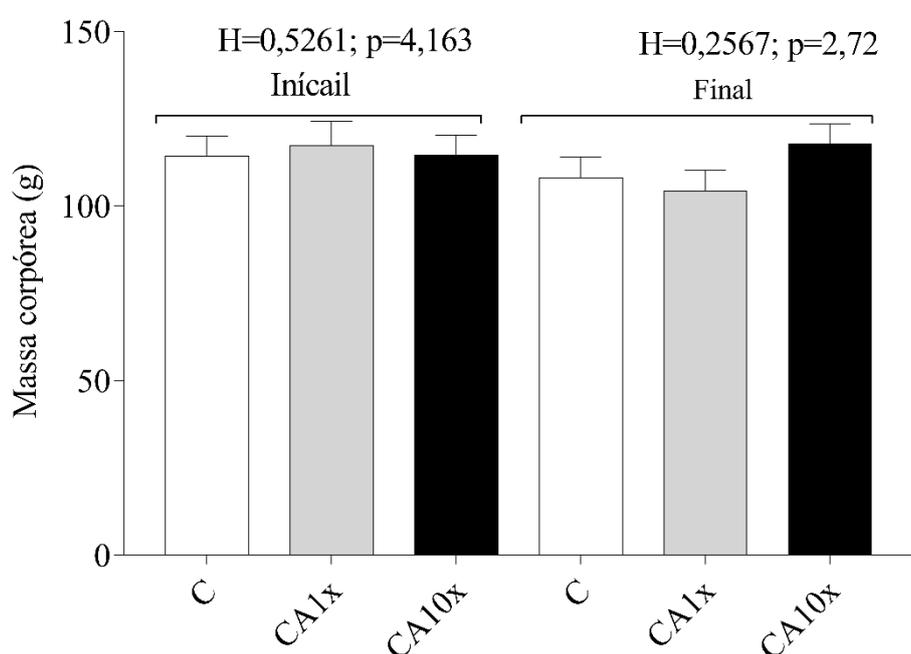
Os principais compostos orgânicos identificados nas amostras da solução estoque referente ao lixiviado bruto 100% identificados na água e nos demais tratamentos podem ser observados na Figura 8.



**Figura 8.** A Fórmula estrutural atribuída aos íons mais intensos detectados na solução estoque do lixiviado de cigarros fumados obtida por ESI (-) Orbitrap MS. Todos os íons foram detectados como  $[M-H]^-$ . B Fórmula estrutural atribuída aos íons mais intensos detectados em ESI (+) Orbitrap MS. Todos os íons foram detectados como  $[M+H]^+$ .

Inicialmente, as análises estatísticas não revelaram incremento sobre a massa corporal dos animais, sendo que ao final do experimento todos os grupos apresentaram a mesma massa corpórea em relação àquela aferida no início do experimento (Figura 9).

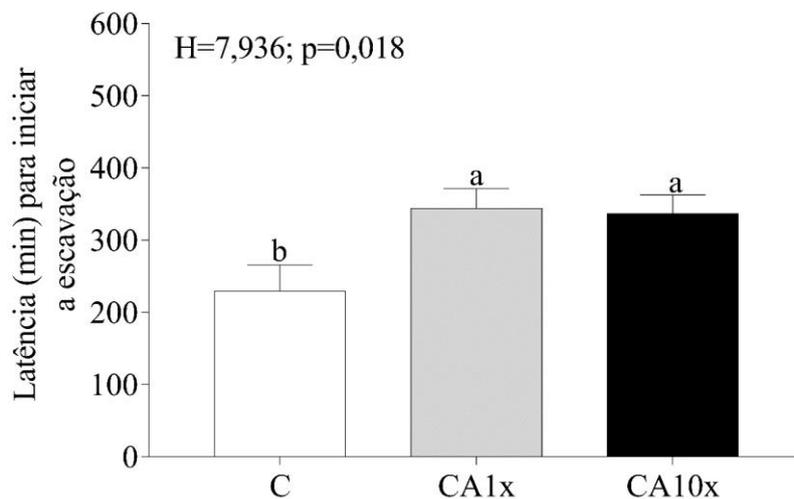
Logo podemos supor que o curto período de exposição os animais não apresentaram nenhuma perda ou incremento de massa corpórea, mas, no entanto, não podemos afirmar com tamanha certeza, pois os bivalves se alimenta por filtração, e tal exposição pode ter afetado significativamente essa função, mas, porém, nenhuma análise do tipo foi realizada no presente estudo necessitando do desenvolvimento de novos estudos.



**Figura 9.** Massa corpórea inicial e final dos bivalves expostos ou não à água contaminada nas concentrações C (controle apenas água tratada de clorada, CA1x (Concentração ambiental 1x), CA10x (Concentração ambiental 10x). As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão, submetido ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Portanto, os dados contidos na figura 10 demonstraram que os animais tratados com lixiviados de bitucas de cigarros fumados, teve sua resposta defensiva comportamental afetada quando submetidos a uma situação de predação simulada. Observamos que os animais apresentaram diminuição no comportamento de escavação na maioria dos indivíduos dos grupos tratados CA1x e CA10x, os bivalves não conseguiram, posicionar suas conchas verticalmente e conseqüentemente mover-se horizontalmente na superfície

do substrato, incapacitados de se enterrar. Esses tipos de comportamento corroboram com estudos similares que avaliaram a capacidade de enterramento do bivalves *Tapes philippinarum* expostos a contaminantes emergentes, afetando sua capacidade de enterramento (Matozzo et al., 2004). A escavação é de fundamental importância para sobrevivência de moluscos, pois permite evitar predadores (Matozzo et al., 2004). Alterações no comportamento de escavação (atraso e/ou a não escavação) é um indício de potencial toxicidade provocada pela contaminação da água através da exposição direta com o lixiviado de bitucas de cigarros fumados, como podemos notar em estudos anteriores que avaliaram a presença de outros contaminantes nos corpos d'água (Byrne & O'Halloran 2000; Shin et al., 2002).

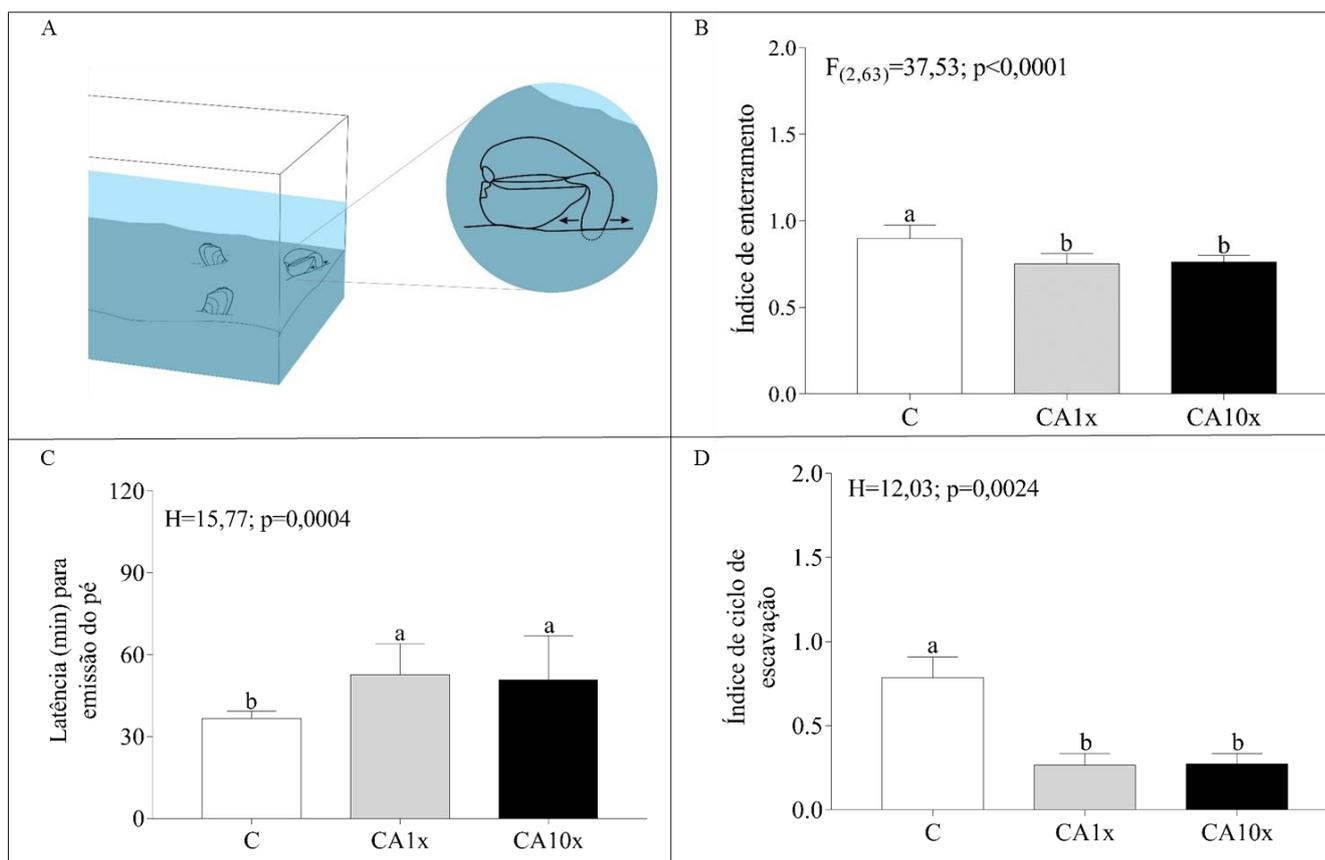


**Figura 10.** Latência para começar a escavar do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não à água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, a 5% de probabilidade.

Na figura 11 A é demonstrado uma figura esquemática do comportamento de escavação realizado na fase I do enterramento. Também observamos efeito dos tratamentos sobre os parâmetros “índice de enterramento” (Figura 11 B) a análise estatística revelou que os animais expostos ao lixiviado de cigarro apresentaram menores índices quando comparados aos animais não expostos. Quanto maior o índice de ciclos de enterramento menor será o número de tentativas de enterramento, ou seja, o bivalve levará um menor tempo até atingir sua posição final após o período de filmagens de 7

horas. Esse índice pode estar relacionado com tamanho dos grãos de areia, assim como discutido no trabalho desenvolvido por Cândido & Romero (2007), aumentando ou diminuindo os ciclos de escavação. No entanto, considerando que os substratos utilizados foram os mesmos para todos os grupos, acreditamos que o desempenho reduzido dos animais neste teste pode estar correlacionado à mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos presentes no lixiviado de cigarros fumados.

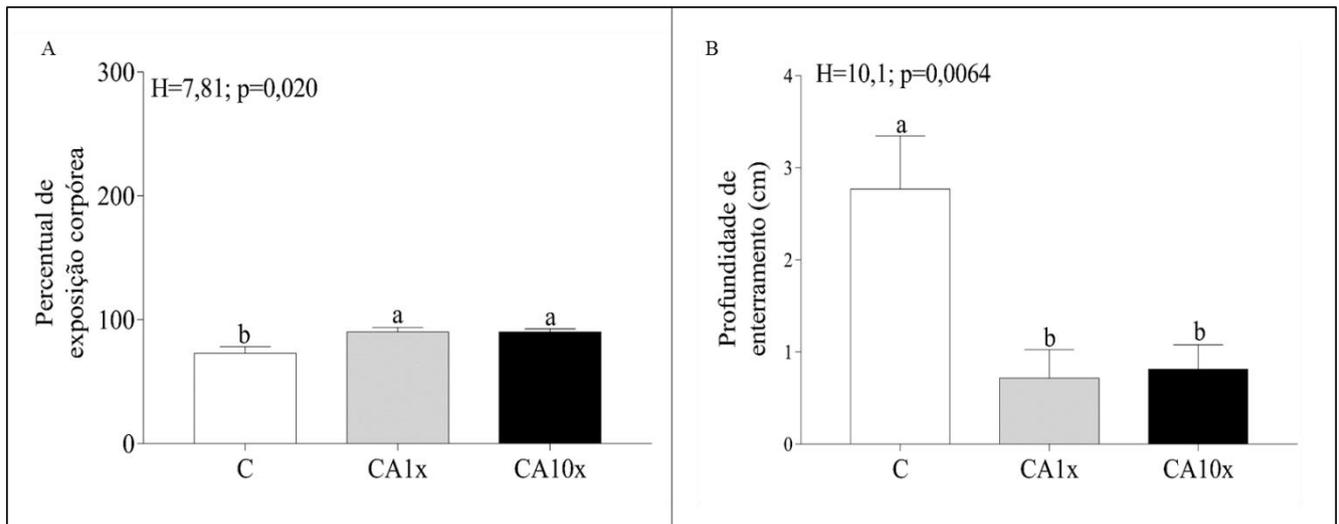
Quanto ao parâmetro “latência para emissão do pé” (Figura 11 C) avaliado no teste de resposta antipredatória simulada, observamos diferenças significativas entre o grupo controle e os demais tratamentos (CA1x e CA10x). Os animais tratados com lixiviado de cigarro gastaram maior tempo para emitir os pés pela primeira vez. Esse tipo de comportamento em um ambiente natural pode proporcionar a estes animais maior risco de predação, já que o tempo de início de resposta à situação simulada foi maior (Lin, 1991; Cândido & Romero, 2007). Para o “índice de ciclos de escavação” (Figuras 11 D) tratados com lixiviados de bitucas de cigarros fumados tiveram uma performance de enterramento reduzida durante o período de filmagem, tal comportamento reduzido pode ser explicado devido a presença de compostos tóxicos, a exemplo da nicotina.



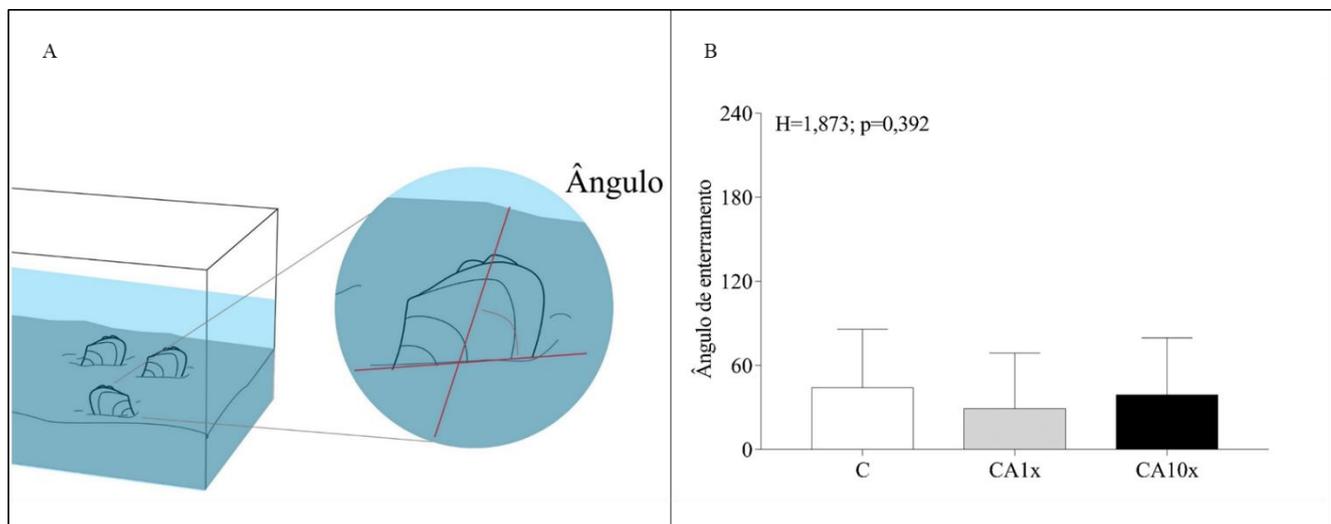
**Figura 11.** (A) Imagem ilustrativa do comportamento de escavação Fase I, exibido pelo bivalve durante os testes comportamentais, (B) índice de ciclos de escavação e (C) latência (minutos) para emissão do pé do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatística. Em “B e C” os dados foram com pós-teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Em “D” os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn’s, a 5% de probabilidade.

Além disso, observamos que os bivalves dos grupos CA1x e CA10x apresentaram diferença estatística significativa em relação ao percentual de exposição corpórea externa (Figura 12 A), e uma menor profundidade de enterramento quando comparado com o grupo controle. Mais uma vez nossos resultados comprovam que lixiviado tem a capacidade de afetar o comportamento de escavação deste grupo de invertebrado

aquático.



**Figura 12.** (A) Percentual de exposição corpórea e (B) profundidade de enterramento do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, a 5% de probabilidade.



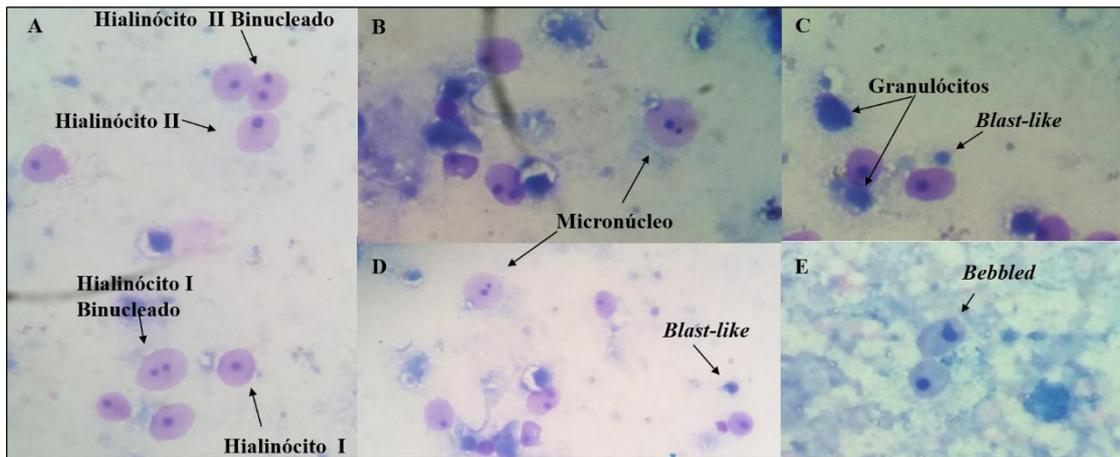
**Figura 13.** (A) Imagem ilustrativa do ângulo de enterramento. (B) Ângulo de enterramento do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, a 5% de probabilidade.

Os bivalves apresentam um sistema de escavação diferente dos demais invertebrados aquáticos, eles utilizam o seu pé para perfurar o substrato provocando a escavação vertical ou autoenterramento, figura 13. Dependendo do ângulo de inclinação, os bivalves diminuem os riscos de serem predados e maximizam o seu centro de gravidade em relação ao substrato, diminuindo assim a possibilidade de serem levados pelo fluxo d'água (Trueman et al., 1966; Zwarts et al., 1989; Sassa et al., 2011).

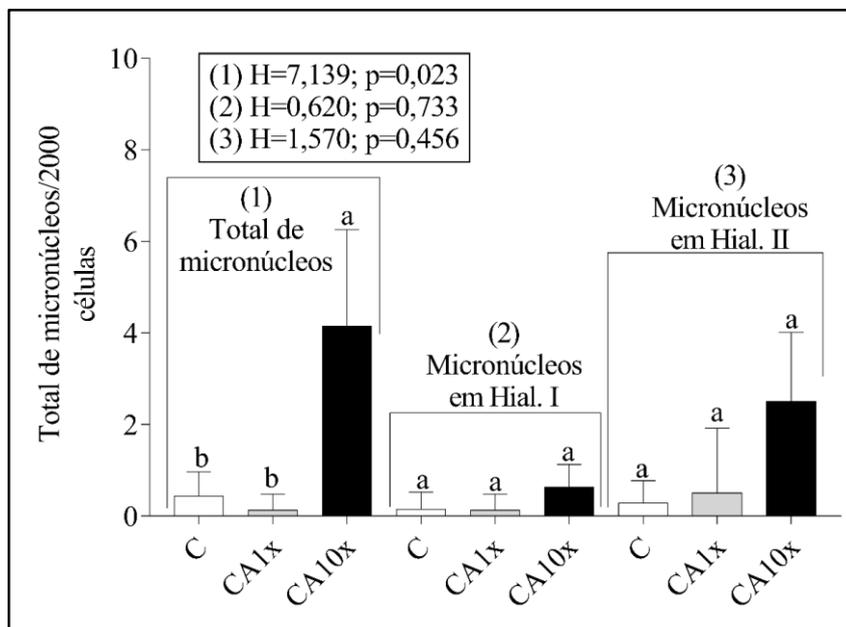
Em relação à hemolinfa dos bivalves, sabe-se que esta desempenha um importante papel nos tecidos moles (Bolognesi & Fenech., 2012). Os hemócitos circulantes no sistema vascular aberto, estão envolvidos em processos vitais, tais como transporte de nutrientes, digestão, reparação tecidual e eliminação de substâncias tóxicas (Bolognesi & Fenech., 2012). A hemolinfa dos bivalves *A. trapesialis* contém quatro populações principais de hemócitos: células *blast-like*, hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e granulócitos (Figura 14). Dois subtipos de hialinócitos foram identificados: hialinócitos tipo I e hialinócitos tipo II. Os hialinócitos tipo I (Figura 14 A) são células de tamanho intermediário com relação núcleo/citoplasmas com núcleo excêntrico ou levemente excêntrico. Por outro lado, os núcleos dos hialinócitos do tipo II são claramente excêntricos e seu citoplasma continha pequenos vacúolos (Figura 14 A).

A avaliação do potencial mutagênico do lixiviado revelou alterações significativas nos hemócitos circulantes dos animais avaliados. Observamos maior frequência de células micronucleadas nos bivalves expostos ao lixiviado, em relação ao grupo controle (Figura 14 B e D). A alta incidência de MN na hemolinfa circulante dos bivalves corrobora com o estudo de Thouahri et al. (2016), em que os autores observaram maior frequência no número de MN na hemolinfa do molusco *Mytilus galloprovincialis* expostos a poluição portuária *in situ*, estes animais foram mantidos em gaiolas subdivididos em três grupos por um período de 1, 3 e 6 meses de exposição.

Além da presença de MN, observamos células binucleadas em diferentes tipos de hialinócitos e núcleos *bebbled* (Figura E), com maior frequência nos animais expostos aos tratamentos.



**Figura 14.** Micrografia de luz dos hemócitos de *A. trapesialis* expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados. Hemócitos corados com panótico rápido.

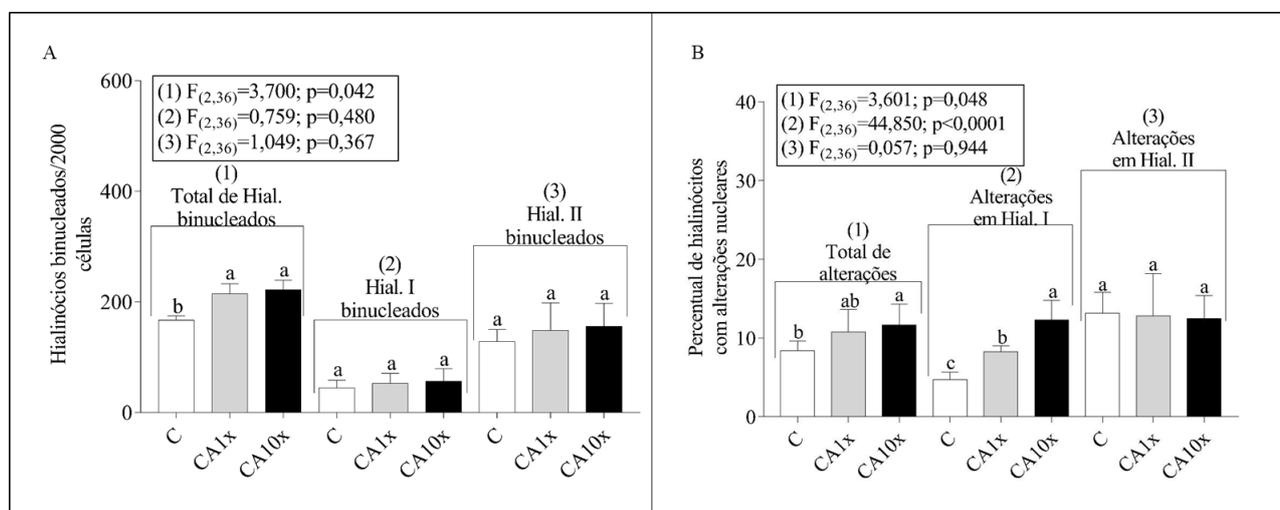


**Figura 15.** Total de micronúcleos identificados nos hemócitos do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

A avaliação do potencial mutagênico do lixiviado revelou alterações significativas nos hemócitos circulantes do bivalve. Houve uma maior frequência de hialinócitos micronucleados dos bivalves expostos ao lixiviado do que no grupo controle após 14 dias de exposição (Figura 15). Havendo diferença no total de micronúcleos (Figura 15 “1”), não havendo diferença significativa no número de micronúcleos quando analisado

separadamente os hialinócitos tipo I e II (Figura 15 “2 e 3”). A alta incidência de MN na hemolinfa circulante desta espécie de bivalve corrobora com o estudo de Thouahri et al., (2016) que observou maior número de MN na hemolinfa do que nas brânquias, intensificando ainda mais a importância do uso da hemolinfa de tecidos moles ao invés da hemolinfa presentes nas brânquias.

Em nossos dados, podemos observar a presença de algumas anormalidades (células binucleadas em diferentes tipos de hialinócitos, *bebbled* e micronúcleos) figura 16 A e B. Assim como para o padrão observado para MN, outros tipos de anormalidades nucleares dos hemócitos aumentaram significativamente durante o período de exposição e entre os grupos expostos, havendo diferenças significativas nos hialinócitos tipo I dos grupos C1x e C10x ao ser comparados ao grupo controle (Figura 16 A “2”) o mesmo ocorre para o total de anormalidades (hialinócitos tipo I+II) (Figura 16 A “1”), diferentemente do que ocorre nos hialinócitos tipo II, não apresentando diferença significativa. Observamos diferenças significativas nos hialinócitos tipo I dos grupos C1x e C10x ao ser comparados ao grupo controle (Figura 16 B). Além disso, o total de alterações nucleares foi superior no grupo C10x, em relação ao grupo controle (Figura 16 B “1”) seguido do número de alterações no hialinócitos I (Figura 16 B “2”), não havendo diferença significativa nas alterações nucleares dos hialinócitos II (Figura 16 B “3”).

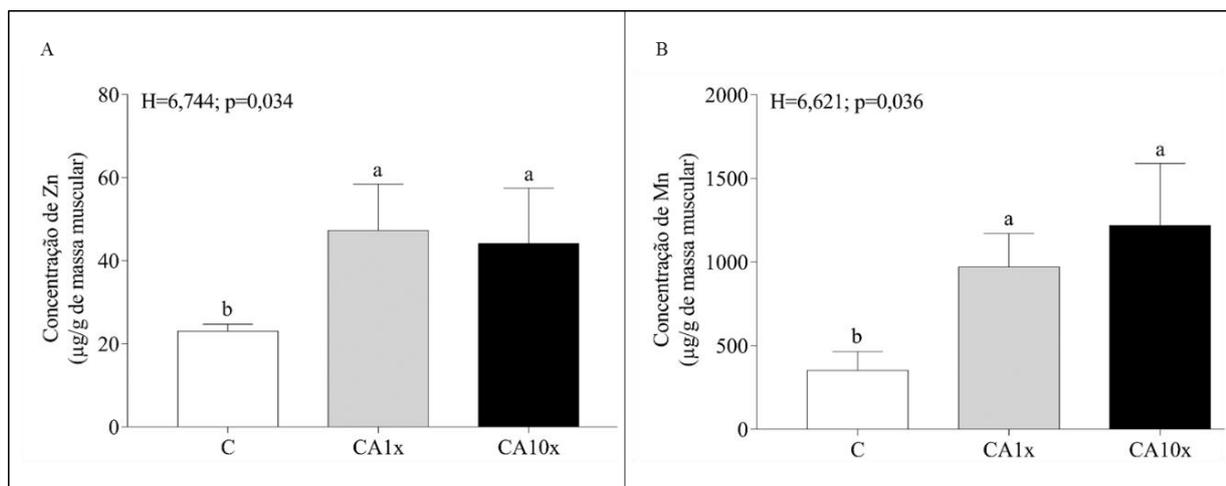


**Figura 16.** A) Hialinócitos binucleados e (B) percentual de células com alterações nucleares do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não a água contendo lixiviado de cigarros fumados. As barras indicam a média ± desvio padrão. Letras diferentes significam diferenças estatística.

Embora o mecanismo de formação de tais anormalidade ainda não sejam bem compreendidos para a referida espécie, há indícios de que estas anormalidades nucleares sejam induzidas pela exposição a uma variedade de agentes genotóxicos e mutagênicos que podem agir de forma sinérgica, antagônica e/ou aditiva devido à ação da nicotina e etilfenol isolada relatada por Micevska et al. (2006).

O efeito mutagênico provocado pelo lixiviado de bituca de cigarros nos bivalves na literatura pode encontrar diferentes tipos de trabalhos que expuseram uma variedade de organismos aquáticos, semiaquáticos e terrestres ao lixiviado. Com que diz respeito aos organismos aquáticos, podemos observar uma variedade de efeitos prejudiciais, assim como, toxicidade de cladóceros *D. magna* e imobilização *C. cf. dubia*, perda da bioluminescência da bactéria marinha *V. fischeri* (Register., 2000, Micevska et al., 2006).

A concentração de Zn nos tecidos musculares nos tratamentos C1x e C10x foram significativamente maiores, quando comparadas àquelas observadas no grupo controle (Figura 17 A), o mesmo ocorreu para os metais Mn cuja concentração nos tratamentos foi maior que controle (Figura 17 B).



**Figura 17.** A) Concentração de Zn, (B) concentração de Mn do tecido muscular do bivalve *A. trapesialis* submetidos aos testes comportamentais expostos ou não água contendo lixiviado de cigarros fumados nas concentrações CA1x e CA10x. As barras indicam a média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's, a 5% de probabilidade.

A alta concentração desses metais podem ser explicados devido ao fato de que os bivalves são excelentes filtradores de água, desempenhando uma alta capacidade de acúmulo

de metais e outras substâncias nos órgãos e tecidos. Para que possamos compreender melhor como os metais afetam este modelo de organismo aquático, primeiro devemos entender como estes compostos presentes no lixiviado interagem com o organismo, podendo ser de forma aditiva, sinérgica ou antagônica, variando de acordo com a sua interação com o meio ambiente (Spurgeon et al., 2010; Nikinmaa, 2014, Oliveira et al., 2018; Oliveira et al., 2018). Estas interações podem ocorrer de várias formas, um exemplo claro em nosso estudo, é que a interação de um ou mais compostos pode afetar a maneira que os metais são absorvidos e/ou de se ligarem a certas proteínas ou até mesmo a forma com que ele é excretado (desintoxicação) (Rand, 1995).

Alguns dos metais indetificados são elementos essenciais envolvidos em importantes funções celulares. O Zn e o Mn são responsáveis pelas atividades enzimáticas, estabilidade e metabolização de proteínas e ácidos nucleicos, defesas antioxidantes (Miller, 2004; Wood, 2012), dentre outras. Na análise do lixiviado utilizado neste estudo podemos notar a presença destes dois metais em alta concentração nas diluições utilizadas nos dois tratamentos (Tabela 2). Tais concentrações elevadas podem ter forte relação com algumas alterações celulares indetificadas nos hemócitos deste modelo experimental, a exemplo do Zn, metal essencial responsável pela regulação da metalotioneína (MT), que por sua vez, regula as concentrações de íons metálicos essenciais e não essenciais está correlacionado com a captura de espécies reativas de oxigênio (ROS). O Mn é responsável pela capacidade antioxidante nos bivalves (Campanella et al., 2005; Laity et al., 2007), tais alterações na absorção destes metais podem ter levado ao aparecimento das anormalidades nucleares nos hemócitos circulantes destes animais.

Há presença de Zn pode ter contribuído para o aparecimento de algumas anormalidades nucleares, pois este metal essencial e elevada concentração aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando prejuízos para as defesas antioxidantes (Trevisan et al., 2014) diminuição na capacidade antioxidante e aumento da peroxidação lipídica (Wadige et al., 2014). O aumento nas espécies reativas de oxigênio está fortemente correlacionada com o aparecimento das anormalidades nucleares (Figura 15, 16)

Há alta prevalência de células micronucleadas nos hialinócitos tipo (I e II) pode ser explicado devido ao estresse oxidativo, assim como registrado para peixes (Gabriel et al., 2013) e o efeito neurotóxico que pode ter afetado o comportamento de escavação (Figura 10).

#### 4. CONCLUSÃO

Nossos dados confirmaram a hipótese inicial de que o lixiviado de bitucas de cigarros em concentrações encontradas no ambiente altera as respostas defensivas dos bivalves, quanto a uma tentativa de predação simulada, aumento no número de anormalidades nucleares e granulócitos. Portanto, nosso estudo é o primeiro a fornecer evidências sobre as consequências da exposição desta espécie de molusco ao lixiviado de bituca de cigarro. Observamos que o uso indiscriminado de bituca de cigarro pode causar sérios prejuízos a biota aquática. Se levarmos em consideração que as concentrações subletais podem ter impacto no comportamento e no aumento de anormalidades nucleares de bivalves sugerimos que novas pesquisas sejam desenvolvidas com o intuito de compreender e mitigar as consequências sofridas por este modelo experimental.

#### 6. REFERÊNCIAS

- Abbasi, Naeem Akhtar et al. Spatial and interspecific variation of accumulated trace metals between remote and urbane dwelling birds of Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 279-286, 2015.
- Alexander, Richard R.; Stanton JR, Robert J.; Dodd, J. Robert. Influence of sediment grain size on the burrowing of bivalves: correlation with distribution and stratigraphic persistence of selected neogene clams. **Palaios**, p. 289-303, 1993.
- Baršienė, Janina et al. Genotoxic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. **Ekologija**, v. 54, n. 1, p. 44-50, 2008.
- Bekele TT (2016) **Investigation of toxicity of cigarette butts collected in Addis Ababa to Swiss albino mice (thesis)**. Addis Ababa University School of Graduate Studies, Department of Biochemistry, Addis Ababa, Ethiopia.
- Boleda, M. Rosa; Huerta-Fontanela, Maria; Ventura, Frances; Galceran, Teresa M. Evaluation of the presence of drugs of abuse in tap waters. **Chemosphere**, v. 84, n. 11, p. 1601-1607, 2011.
- Bolognesi, Claudia; Fenech, Michael. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1125-1135, 2012.
- Booth, David J.; Gribben, Paul; PARKINSON, Kerryn. Impact of cigarette butt leachate on tidepool snails. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 362-364, 2015.

Brunetti R., Gabriele M., Valerio P., Fumagalli O. The micronucleus test: temporal pattern of the base-line frequency in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. **Marine Ecology Progress**. v. 83. p. 75–78, 1992.

Byrne, Pamela A.; O'halloran, John. Acute and sublethal toxicity of estuarine sediments to the manila clam, *Tapes semidecussatus*. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 15, n. 5, p. 456-468, 2000.

Callil, Claudia Tasso; Junk, Wolfgang Johannes. Concentração e incorporação de mercúrio por moluscos bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Castalia ambigua* (Lamarck, 1819) do Pantanal de Poconé-MT, Brasil. **Biociências**, v. 7, n. 1, p. 3-28, 1999.

Callil, Claudia T.; Mansur, Maria CD. Ultrastructural analysis of the shells of *Anodontites trapesialis* (Lamarck) and *Anodontites elongatus* (Swainson)(Mollusca, Bivalvia, Etherioidea) from the Mato Grosso Pantanal Region, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 724-734, 2005.

Campanella, Luigi; Gatta, Tania; Ravera, Oscar. Relationship between anti-oxidant capacity and manganese accumulation in the soft tissues of two freshwater molluscs: *Unio pictorum manicus* (Lamellibranchia, Unionidae) and *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia). **Journal of Limnology**, v. 64, n. 2, p. 153-158, 2005.

Campos, Alexandre; Aprendiz, Itxaso; Da Fonseca, Rute R; Cristobal, Suzana. Shotgun analysis of the marine mussel *Mytilus edulis* hemolymph proteome and mapping the innate immunity elements. **Proteomics**, v. 15, n. 23-24, p. 4021-4029, 2015.

Cândido, da Silva Leonardo Teófilo; ROMERO, Sonia Maria Brazil. Heart rate and burrowing behavior in the mussel *Anodontites trapesialis* (Bivalvia: Mycetopodidae) from lotic and le ntic sites. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 1, p. 131-136, 2006.

Cândido, Leonardo Teófilo da Silva; Romero, Sonia Maria Brasil. A contribution to the knowledge of the behaviour of *Anodontites trapesialis* (bivalvia: Mycetopodidae). The effect of sediment type on burrowing. **Belgian journal of zoology**, v. 137, n. 1, p. 11-16, 2007.

Cobbina, Samuel J; Chen, Yao; Zhou, Chaoxiang; Wu, Cheushan; Feng, Weiwei; Wang Wei, Mao, Guanghua; Xu, Hai; Zhang, Zhen; Wu Xiangyang; Yang, Liuqing. Low concentration toxic metal mixture interactions: Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Chemosphere**, v. 132, p. 79-86, 2015.

- Cardoso, Letícia Silva; Estrela, Fernanda Neves; Chagas, Thales Quitão; Da Silva, Wellington Alves Mizael; Costa, Denys Ribeiro de Oliveira; Pereira, Igor; Vaz, Boniek Gontijo; Rodrigues, Aline Sueli de Lima. The exposure to water with cigarette residue changes the anti-predator response in female Swiss albino mice. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 9, p. 8592-8607, 2018.
- Castellanos, Z. A.; Landoni, N. La familia Mycetopodidae Gray, 1840 em la Republica Argentina. **Fauna de agua dulce de la Republica Argentina. Buenos Aires: FECIC**, 1990.
- Dobaradaran, Sina; Nabipou, Iraj; Saeedi, Reza; Ostovar, Afshin; Khosand, Maryam; Khajeahmadi, Nahid; Hayati, Reza; Keshtkar, Mozghan. Association of metals (Cd, Fe, As, Ni, Cu, Zn and Mn) with cigarette butts in northern part of the Persian Gulf. **Tobacco Control**, v. 26, n. 4, p. 461-463, 2017.
- Donaghy, Ludovic; Hong, Hyun-Ki; Lambert, Christophe; Park, Heung-Sik; Shim, Won Joon; Choi, Kwang-Sik. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 87-97, 2010.
- Fedato, R. P; Simonato, J. D; Martinez, C. B. R; Sofia, S. H. Genetic damage in the bivalve mollusk *Corbicula fluminea* induced by the water-soluble fraction of gasoline. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, n. 1, p. 80-85, 2010.
- Felipi, Paula Guardia; Silva-Souza, Ângela Teresa. *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819): a bivalve parasite of freshwater fishes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 895-904, 2008.
- Fenech, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084, 2007.
- Gabriel, Diogo; Riffel, Ana Paula; Finamor, Isabela A; Saccol, Etiane, M. H; Ourique, Giovana M; Goulart, Luis O; Kochhann, Daiani; Cunha, Mauro A; Garcia, Luciano O; Pavanato, Maria A; Val, Adalberto L; Baldisserotto, Bernado; Liesuy, Susana F. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Collossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. **Environmental Contamination and Toxicology**. v. 64, n. 4, p. 656-667, 2013.

- Gill, Hussan; Borges, Kyler; Rehman, Bilal; Moynihan, John; Bergey, Elizabeth A. Cigarette butts may have low toxicity to soil-dwelling invertebrates: Evidence from a land snail. **Science of The Total Environment**, v. 628, p. 556-561, 2018.
- Giovino, Gary A. et al. Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. **The Lancet**, v. 380, n. 9842, p. 668-679, 2012.
- Green, Amy L. Roder; Putschew, Anke; Nehls, Thomas. Littered cigarette butts as a source of nicotine in urban waters. **Journal of hydrology**, v. 519, p. 3466-3474, 2014.
- Healton, Cheryl G; Cummings, K. Michael; O'Connor, Richard; Novotny, Thomas E. Butt really? The environmental impact of cigarettes. **Tobacco Control**, v. 20, n. Suppl 1, p. 1-1, 2011.
- Hoellein, Timothy et al. Anthropogenic litter in urban freshwater ecosystems: distribution and microbial interactions. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98485, 2014.
- Hon, Nyok- Sai. Photodegradation of cellulose acetate fibers. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 15, n. 3, p. 725-744, 1977.
- Jacomini, Analu Egydio; Avelar, Wagner Eustáquio Paiva; Martinêz, Alexandre Souto; Bonato, Pierina Sueli. Bioaccumulation of atrazine in freshwater bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 3, p. 387-391, 2006.
- Keusch, Stephan; Hildenbrand, F. F; Bollmann, T; Halank, M; Held, M; Kaiser, R; Kovacs, G; Lange, T. J; Seyfarth, H. J; Speich, R; Ulrich, S. Tobacco smoke exposure in pulmonary arterial and thromboembolic pulmonary hypertension. **Respiration**, v. 88, n. 1, p. 38-45, 2014.
- Kuwae, Tomohiro; Miyoshi, E; Sassa, S; Watabe, Y. Foraging mode shift in varying environmental conditions by dunlin *Calidris alpina*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 406, p. 281-289, 2010.
- Laity, John H.; Andrews, Glen K. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 463, n. 2, p. 201-210, 2007.
- Lassudrie, Malwenn et al. Physiological responses of Manila clams *Venerupis* (= *Ruditapes*) *philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 27-38, 2014.

Lawal MS, Ologundudu SO (2013) Toxicity of cigarette filter leachates on *Hymenochirus curtipes* and *Clarias gariepinus* in Nigeria. **Journal of Environmental Extension** 11:7–14.

Lee W, Lee CC. Developmental toxicity of cigarette butts—an underdeveloped issue. **Ecotoxicology Environmental Safety**. v.113:362–368, 2015.

Liu, Jiayu; Liang, Jie; Yuan, Xingzhong; Zeng, Guangming; Yuan, Yujie; Wu, Haipeng; Huang, Xiaolong; Liu, Junfeng; Hua, Shanshan; Li, Fei; Li, Xiaodong. An integrated model for assessing heavy metal exposure risk to migratory birds in wetland ecosystem: a case study in Dongting Lake Wetland, China. **Chemosphere**, v. 135, n.1, p. 14-19, 2015.

Li CH, Shen Cc, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW, Kang JJ. Organobiodistribution, clearance and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. **Nanotoxicology**, v. 6, n.7, p. 746-756, 2012.

Lin, Junda. Predator-prey interactions between blue crabs and ribbed mussels living in clumps. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 32, n. 1, p. 61-69, 1991.

Lopes, João Luis Callegari et al. *Anodontites trapesialis*: a biological monitor of organochlorine pesticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 351-354, 1992.

Loayza-muro, Raúl; Elías-letts, Rafaela. Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: effect of pH, temperature and metals on filtration rate. **Environmental Pollution**, v. 149, n. 2, p. 209-215, 2007.

Mackay, J.; Eriksen, M.; Shafey, O. The Tobacco Atlas, 2nd Ed. **The American Cancer Society**, Atlanta, GA, USA, 2006.

Magni P., De Falco G., Falugi C., Franzoni M., Monteverde M., Perrone E., Sgro M., Bolognesi C. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). **Environmental Pollution**. v. 142. p. 65–72, 2006.

Matozzo, Valerio; BALLARIN, Loriano; MARIN, Maria Gabriella. Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4-nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. **Marine pollution Bulletin**, v. 48, n. 5-6, p. 563-571, 2004.

Mengel, Alex Alexandre; Aquino, Silvia Lima de. A cadeia produtiva do tabaco como campo de disputas. **Mundo Agrario**, v. 18, n. 38, p. 00-00, 2017.

Micevska T, Warne MS, Pablo F, Patra R. Variation in, and causes of, toxicity of cigarette butts to a cladoceran and microtox. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 205–212, 2006.

Miller, Anne-Frances. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 2, p. 162-168, 2004.

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.

Moriwaki, H., Kitajima, S., Katahira, K., 2009. Waste on the roadside, ‘poi-sute’ waste: its distribution and elution potential of pollutants into environment. **Waste Manag.** 29, 1192–1197.

Muwonge, Richard; Ramandas, Kunnambath; Sankila, Risto; Thara, Somanathan; Thomas, Gigi; Vinoda, Jissa; Sankaranarayanan, Rengaswamy. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. **Oral Oncology**, v. 44, n. 5, p. 446-454, 2008.

Nikinmaa, Mikko. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Elsevier, 2014.

Novotny, Thomas E; Lum, Kristen; Smith, Elizabeth; Wang, Vivian; Barnes Richard. Cigarettes butts and the case for an environmental policy on hazardous cigarette waste. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 5, p. 1691-1705, 2009.

Novotny, Thomas E.; Slaughter, Elli. Tobacco product waste: an environmental approach to reduce tobacco consumption. **Current Environmental Health Reports**, v. 1, n. 3, p. 208-216, 2014.

Oliveira, Luciana Fernandes; Cabral, Millena Terezinha; Vieira, Carlos Eduardo Delfino; Antoniazzi, Matheus Henrique; Risso, Wagner Ezequiel; Martinez, Claudia Bueno dos Reis. Metals bioaccumulation and biomarkers responses in the neotropical freshwater clam *Anodontites trapesialis*: Implications for monitoring coal mining areas. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 983-991, 2016.

Oliveira, Luciana Fernandes; Cabral, Millena Terezinha; Risso, Wagner Ezequiel; Martinez, Claudia Bueno dos Reis. Single and combined effects of Zn, Mn and Fe on the neotropical freshwater bivalve *Anodontites trapesialis*: Bioaccumulation and biochemical biomarkers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, n. 1, p. 735-745, 2018.

Osuola FI, Abiodun OA, Igwo-Ezikpe MN, Kemabonta KA, Otitoloju AA. Relative toxicity of cigarette butts leachate and usefulness of antioxidant biomarker

activity in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas, 1983). **Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management**. V. 10, n. 1, p. 75-88, 2017.

Pelit, Füsün Okçu; Demirdöğen, Ruken Esra; Henden, Emür. Investigation of heavy metal content of Turkish tobacco leaves, cigarette butt, ash, and smoke. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 11, p. 9471-9479, 2013.

Parker TT, Rayburn JA. Comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of *Xenopus laevis* embryos. **Toxicology Reports**. v. 4, p. 77–82, 2017.

Puls, Juergen; Wilson, Steven A.; Hölter, Dirk. Degradation of cellulose acetate-based materials: a review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 1, p. 152-165, 2011.

Rand, G. M. Aquatic toxicology: **Introduction to aquatic toxicology**. 3rd. 1995.

Ray, Mitali et al. Density shift, morphological damage, lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of Indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 2, p. 499-512, 2013.

Register, Kathleen. Cigarette Butts as Litter- Toxic as Well as Ugly?. **Underwater Naturalist**, v. 25, n. 2, p. 23-29, 2000.

Rigonato, Janaina; Mantovani, Mário Sérgio; Jordão, Berenice Quinzani. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 464-468, 2005.

SASSA, Shinji et al. Burrowing criteria and burrowing mode adjustment in bivalves to varying geoenvironmental conditions in intertidal flats and beaches. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25041, 2011.

Shin, P. K. S.; NG, A. W. M.; Cheung, R. Y. H. Burrowing responses of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* to sediment contaminants. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1-12, p. 133-139, 2002.

Simone, Luiz Ricardo Lopes de. **Land and freshwater molluscs of Brazil**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2006.

Schneider, J.E., Peterson, N.A., Kiss, N., Ebeid, O., Doyle, A.S., 2011. Tobacco litter costs and public policy: a framework and methodology for considering the use of fees to offset abatement costs. **Tob. Control**. 20, 136–141.

- Seco Pon, J.P., Becherucci, M.E., 2012. Spatial and temporal variations of urban litter in Mar del Plata the major coastal city of Argentina. **Waste Manag.** 32 (2), 343–348.
- Siu, Stanley YM; Lam, Paul K. S; Martin, Michael; Caldwell, Christopher W; Richardson, Bruce J. The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): a validation study in Hong Kong coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, n. 6-12, p. 479-492, 2008.
- Slaughter, Elli; Gersberg, Richard M; Watanabe, Kayo; Rudolph, Jhon; Stransky, Chris; Novotny, Thomas E. Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. **Tobacco Control**, v. 20, n. Suppl 1, p. 25-29, 2011.
- Schultz, P.W., Bator, R.J., Large, L.B., Bruni, C.M., Tabanico, J.J., 2013. Littering in context: personal and environmental predictors of littering behavior. **Environmental Behavior**. 45 (1), 35–59.
- Spurgeon, David J; Jones, Oliver A. H; Dorne, Jean-Lou C. M; Syendsen, Claus; Swain, Suresh; Sturzenbaum, Stephen R. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3725-3734, 2010.
- Tomazelli, Andréa C; Martinelli, Luiz A; Avelar, Wagner E. P; De Camargo, Plínio B; Fostier, Anne-Helene; Ferraz, Epaminondas S. B; Krug, Francisco J; Júnior Dário Santos. Biomonitoring of Pb and Cd in two impacted watersheds in Southeast Brazil, using the freshwater mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mycetopodidae) as a biological monitor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 673-684, 2003.
- Touahri, Hamida Gherras; Bautiba, Zitouni; Benquedda, Wacila; Shaposhnikov, Sergey. Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, n. 1, p. 52-64, 2016.
- Trevisan, Rafael; Flesch, Samira; Mattos, Jacó Joaquim; Milani, Márcio Raimundo; Bairy, Afonso Celso Dias; Dafre, Alcir Luiz. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 159, n. 1, p. 22-30, 2014.

Trueman, E. R.; Brand, A. R.; Davis, P. The effect of substrate and shell shape on the burrowing of some common bivalves. **Journal of Molluscan Studies**, v. 37, n. 2, p. 97-109, 1966.

Yamamoto, Maria Emília; Volpato, Gilson Luiz. Comportamento animal. **Natal: UFRN**, Capítulo 6, Comportamento e adaptação, 2007.

Wadige, Chamani PM Marasinghe; Maher, William A; Tyalor, Anne M; Krikowa, Frank. Exposure–dose–response relationships of the freshwater bivalve *Hyridella australis* to cadmium spiked sediments. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 361-371, 2014.

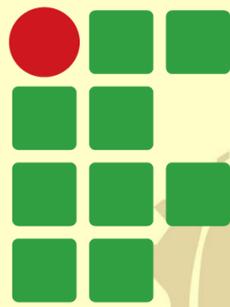
Wood, Chris M. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2011. p. 1-51.

United Nations, online United Nations, Department of Economic and Social Affairs Population Estimates and Projections Section World Urbanisation Prospects. The 2011 Revision. <[http://esa.un.org/unup/pdf/WUP2011\\_Highlights.pdf](http://esa.un.org/unup/pdf/WUP2011_Highlights.pdf)> (accessed 11.09.2018).

Wright, Stephanie L; Rawe, Dorren; Reid, Malcolm J; Thomas, Kevin V; Galloway, Tamara S. Bioaccumulation and biological effects of cigarette litter in marine worms. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14119, 2015.

Yuan, Jian-Min; Nelson, Heather H; Carmella, Steven G; Wang, Renwei; Kuriger-Laber, Jacquelyn; Jin, Aizhen; Adams\_haduch; Hecht, Stephen S; Koh, Woon-Pauy; Murphy, Sharon E. CYP2A6 genetic polymorphisms and biomarkers of tobacco smoke constituents in relation to risk of lung cancer in the Singapore Chinese Health Study. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 4, p. 411-418, 2017.

Zwarts, Leo; Wanink, Jan. Siphon size and burying depth in deposit-and suspension-feeding benthic bivalves. **Marine Biology**, v. 100, n. 2, p. 227-240, 1989.



# **INSTITUTO FEDERAL**

Goiano

---

Campus  
Urutaí

