



# Ensaio de toxicidade das beatas de cigarro na água utilizando *Artemia franciscana*

Jéssica Filipa Pereira Alves

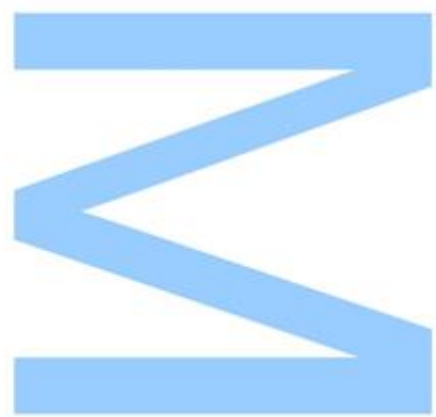
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

2021

## Orientador

Maria da Natividade Ribeiro Vieira, Professora Associada com Agregação, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**W**

S

Q

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer às pessoas que me apoiaram durante esta etapa e que estiveram a meu lado tanto nos momentos felizes como nos momentos de dificuldade.

Agradeço a minha orientadora, professora Maria da Natividade Ribeiro Vieira, pela oportunidade, assim como pelos ensinamentos e apoio prestados durante a realização deste trabalho.

Agradeço a minha família, especialmente os meus pais, pela ajuda e esforços que fizeram, pelo carinho e paciência. Sem eles não teria chegado onde cheguei. À minha irmã que me animou em momentos menos bons. E também às minhas gatinhas que me alegraram com a companhia que me deram, pelos mimos e brincadeira.

Agradeço à Sofia por todos estes anos de amizade, pelo suporte emocional, por me ouvir, aconselhar e acompanhar sempre que precisei.

Por fim também gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, Elisangela, Tiago e Bruno, pela companhia e por me ajudarem.

## Resumo

As beatas de cigarro constituem uma das formas de poluição mais comuns mundialmente, entrando nos sistemas aquáticos através das chuvas, escorrências, rios (entre outros), após serem descartadas inapropriadamente. A sua vasta distribuição, acumulação e difícil biodegradação apresenta um risco para o meio ambiente e para os organismos. Assim, este trabalho tem o objetivo de estudar os efeitos toxicológicos das beatas fumadas (BF) e não fumadas (BNF) de cigarro em náuplios e indivíduos adultos de *Artemia franciscana* em várias concentrações-teste em ensaios de toxicidade aguda. A *A. franciscana* é um crustáceo pequeno que habita em ambientes hipersalinos e com resistência a condições ambientais adversas. Nos ensaios realizados, avaliou-se a mortalidade de náuplios e de indivíduos adultos da espécie ao fim de 96h utilizando lixiviados de beatas fumadas (BF) e beatas não fumadas (BNF). Os resultados obtidos mostraram que ambos os lixiviados foram tóxicos para os náuplios e indivíduos adultos. Os ensaios com os náuplios obtiveram valores de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  iguais a 0,59; 0,80 e 1,42 BF/L e 3,88; 4,28 e 5,17 BNF/L. Para os indivíduos adultos, os  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  corresponderam a 0,90; 1,32 e 2,75 BF/L e 1,96; 2,72 e 5,05 BNF/L, respetivamente. Foi possível observar uma maior tolerância por parte dos indivíduos adultos ao lixiviado com beatas fumadas (BF) comparado com os náuplios. Apesar de ter sido possível verificar os impactos negativos que as beatas apresentam nesta espécie, são necessários mais estudos sobre esta temática.

Palavras-chave: beatas de cigarro, *Artemia franciscana*, toxicidade.

## Abstract

Cigarette butts are one of the most common forms of pollution worldwide, entering aquatic systems through rain, runoff, rivers (among others), after being inappropriately disposed of. Its wide distribution, accumulation and difficult biodegradation pose a risk to the environment and organisms. Thus, this work aims to study the toxicological effects of smoked (BF) and non-smoked (BNF) cigarette butts in nauplii and adult individuals of *Artemia franciscana* at various test concentrations in acute toxicity trials. *A. franciscana* is a small crustacean that lives in hypersaline environments and is resistant to adverse environmental conditions. In the tests carried out, the mortality of nauplii and adult individuals of the species was evaluated after 96 hours using leachates from smoked cigarette butts (BF) and non-smoked cigarette butts (BNF). The results obtained showed that both leachates were toxic to nauplii and adult individuals. The tests with the nauplii obtained values of  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  equal to 0.59, 0.80 and 1.42 BF/L and 3.88, 4.28 and 5.17 BNF/L. For adult individuals, the  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  corresponded to 0.90, 1.32 and 2.75 BF/L and 1.96, 2.72 and 5.05 BNF/L, respectively. It was possible to observe a greater tolerance for adult individuals to the leachate with smoked-end cigarette butts (BF) compared to nauplii. Although it was possible to verify the negative impacts that cigarette butts have on this species, further studies on this subject are needed.

Keywords: cigarette butts, *Artemia franciscana*, toxicity.

# Índice

1. Introdução.....	10
1.1. Beatas de cigarro .....	10
1.1.1 Preocupações quanto à sua distribuição.....	10
1.1.2 Constituintes das beatas .....	11
1.1.3 Lei, sensibilização do público e recolha.....	13
1.2. Artemia .....	13
1.2.1 Taxonomia .....	13
1.2.2 Morfologia externa.....	14
1.2.3 Morfologia interna.....	16
1.2.4 Reprodução e ciclo de vida.....	17
1.2.5 <i>Artemia franciscana</i> como modelo toxicológico.....	18
1.3. Objetivos .....	19
2. Materiais e Métodos .....	20
2.1. Preparação de água salgada artificial .....	20
2.2. Preparação das soluções-teste.....	20
2.3. Cultura de algas .....	21
2.4. Ensaio de toxicidade em náuplios de <i>A. franciscana</i> .....	21
2.4.1 Obtenção dos organismos .....	21
2.4.2 Ensaio de toxicidade (fase larvar).....	21
2.5. Ensaio de toxicidade em indivíduos adultos de <i>A. franciscana</i> .....	21
2.5.1 Crescimento dos organismos .....	21
2.5.2 Ensaio de toxicidade (fase adulta).....	22
2.6. Análise Estatística: .....	22
3. Resultados.....	23
3.1. Toxicidade do lixiviado das beatas fumadas (náuplios) .....	23
3.2. Toxicidade do lixiviado das beatas não fumadas (náuplios).....	25
3.3. Toxicidade do lixiviado das beatas fumadas (indivíduos adultos) .....	28
3.4. Toxicidade do lixiviado das beatas não fumadas (indivíduos adultos).....	30
4. Discussão .....	33
5. Conclusão.....	36
6. Referências bibliográficas .....	37

## Lista de figuras e de tabelas

Figura 1. Representação da morfologia externa de <i>Artemia</i> , apresentando o corpo dividido em 3 partes: cabeça, tórax e abdómen (adaptado de Amat, 1985).....	16
Figura 2. Fotos de três estados de <i>Artemia franciscana</i> durante o desenvolvimento: A – Eclusão do quisto; B – Náuplio em Instar I; C – Náuplio em Instar II. (Lopalco <i>et al.</i> , 2019) .....	18
Figura 3. Curva concentração-resposta para os náuplios de <i>Artemia franciscana</i> às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC10, LC20 e LC50 para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 0,59; 0,80 e 1,42 BF/L. ....	23
Figura 4. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos náuplios de <i>Artemia franciscana</i> durante o ensaio toxicológico (BF). Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). BF – beatas fumadas.....	24
Figura 5. Curva concentração-resposta para os náuplios de <i>Artemia franciscana</i> às 96h (beatas não fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC10, LC20 e LC50 para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 3,88; 4,28 e 5,17 BF/L. ....	26
Figura 6. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos náuplios de <i>Artemia franciscana</i> durante o ensaio toxicológico (BNF). Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste <i>post-hoc</i> Tukey HSD (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ). BNF – beatas não fumadas. ....	27
Figura 7. Curva concentração-resposta para os indivíduos adultos de <i>Artemia franciscana</i> às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC10, LC20 e LC50 para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 0,90; 1,32 e 2,75 BF/L. ....	28
Figura 8. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos indivíduos adultos de <i>Artemia franciscana</i> durante o ensaio toxicológico (BF).	

Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). BF – beatas fumadas. .... 29

Figura 9. Curva concentração-resposta para os indivíduos adultos de *Artemia franciscana* às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC10, LC20 e LC50 para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 1,96; 2,72 e 5,05 BF/L. .... 30

Figura 10. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* durante o ensaio toxicológico (BNF). Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). BNF – beatas não fumadas. .... 31

Tabela 1. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos náuplios de *Artemia franciscana* com as beatas fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h. .... 24

Tabela 2. Valores obtidos de LC10, LC20 e LC50 do ensaio realizado nos náuplios de *Artemia franciscana* com beatas fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%). .... 25

Tabela 3. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos náuplios de *Artemia franciscana* com as beatas não fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h. .... 26

Tabela 4. Valores obtidos de LC10, LC20 e LC50 do ensaio realizado nos náuplios de *Artemia franciscana* com beatas não fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%). .... 27

Tabela 5. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com as beatas fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h. .... 29

Tabela 6. Valores obtidos de LC10, LC20 e LC50 do ensaio realizado nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com beatas fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%). .... 30

Tabela 7. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos indivíduos adultos de <i>Artemia franciscana</i> com as beatas não fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h.....	31
Tabela 8. Valores obtidos de LC10, LC20 e LC50 do ensaio realizado nos indivíduos adultos de <i>Artemia franciscana</i> com beatas não fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%). .....	32
Tabela 9. Valores de LC50 em várias espécies ao fim de 96h. BF/L – beatas fumadas por litro; BNF – beatas não fumadas por litro; (*48h). .....	33
Tabela 10. Sumário de LC50 em <i>Artemia franciscana</i> de vários compostos em mg/L.	34

# 1. Introdução

## 1.1. *Beatas de cigarro*

O aumento exponencial da população humana e o desenvolvimento da tecnologia tem aumentado a demanda e o fabrico de produtos para satisfazer o estilo de vida moderno ao ponto que o lixo produzido e os compostos introduzidos no meio ambiente, em particular nos recursos hídricos, têm sido alvo de preocupação. O lixo ao entrar no oceano, permanece à superfície da água e é transportado pelas ondas e vento até se afundarem no fundo do mar ou se depositarem nas costas ([Rosas et al., 2021](#)).

As beatas de cigarro constituem uma das formas mais comuns de poluição mundialmente ([Kadir e Sarani, 2015](#)) e cerca de 5,6 triliões de cigarros são fumados por ano ([Parker e Rayburn, 2017](#)). Estima-se que estejam presentes em 22-46% do lixo visível ([Murugan et al., 2017](#)), sendo o item mais recolhido na limpeza de áreas públicas como praias e parques ([Ariza et al., 2008](#)) e encontradas desde áreas urbanas densamente habitadas ([Bator et al., 2011](#); [Novotny et al., 2011](#); [Schultz et al., 2009](#)) até florestas e áreas protegidas ([Valiente et al., 2020](#)). Também são um dos itens mais apanhados por aparelhos de colheita de lixo flutuante em marinas e portos, constituindo cerca de 29% de todo o lixo recolhido (Seabins™, The Seabin Project, 2020; [Plastics Europe, 2019](#)). As beatas são introduzidas nos ecossistemas marinhos através das chuvas, escorrências, rios e, assim, facilmente distribuídas por todo o globo pelas correntes marinhas.

### 1.1.1 Preocupações quanto à sua distribuição

As preocupações quanto à distribuição de beatas de cigarro descartadas são em parte devidas às várias substâncias presentes que acabam por ser libertadas no ambiente ([Moriwaki, 2009](#)) e que afetam os meios aquáticos.

Em Micevska et al. ([2006](#)), a toxicidade aguda de 19 tipos de beatas fumadas de 6 marcas diferentes foram estudadas em espécies da ordem dos Cladocera (*Ceriodaphnia cf. dubia*) e em micróbios (*Vibrio fischeri*). Os lixiviados de beatas preparados foram tóxicos para a *C. cf. dubia* e *V. fischeri* a concentrações inferiores a 25,9 e 832mg L<sup>-1</sup>, respetivamente, e houve uma diferença de 2,9 e 8 vezes entre o lixiviado menos tóxico e o lixiviado mais tóxico para a *C. cf. dubia* e *V. fischeri*, respetivamente. *C. cf. dubia* foi a mais sensível aos lixiviados usados por um fator de, aproximadamente, 15,4.

Em Dieng et al. ([2013](#)), a toxicidade das beatas foi estudada como controlo de mosquitos transmissores de doenças, neste caso, de *Aedes aegypti* (estirpe da Malaysia). A presença das beatas afetou a oviposição: houve uma maior atração de fêmeas grávidas em relação ao meio com mais resíduos de beatas do que com o

controlo, resultando numa maior taxa de deposição de ovos. Apesar de não ter havido diferenças significativas na taxa de eclosão dos ovos entre os meios utilizados (substratos de oviposição encharcados com água da torneira e solução com beatas), a longevidade da descendência que esteve exposta às soluções de beatas foi afetada, esta diminuindo a concentrações inferiores, e ambos os sexos apresentaram menor expectativa de vida na concentração mais alta a que foram expostos.

Em Slaughter *et al.* (2011), foi observada a toxicidade de lixiviados de beatas fumadas (filtro com tabaco e só filtro) e de filtros de beatas não fumadas em peixes marinhos (*Atherinops affinis*) e de água doce (*Pimephales promelas*). O lixiviado de beatas com filtro e tabaco apresentou toxicidade aguda em ambas as espécies com um LC<sub>50</sub> de, aproximadamente, 1 beata/L. O lixiviado com os filtros fumados apresentou um LC<sub>50</sub> de 1,8 beatas/L para *P. promelas* e 4,3 beatas/L para *A. affinis*. Por fim, o lixiviado com os filtros não fumados também apresentou toxicidade aguda, com LC<sub>50</sub> de 5,1 para *A. affinis* e 13,5 para *P. promelas*, havendo um aumento significativo.

Estudos em mamíferos também mostraram ser positivos para a toxicidade das beatas. Em animais domésticos, a ingestão pode causar salivação excessiva, excitação, tremores, vômitos, falta de coordenação, fraqueza, convulsões, falha na respiração e inclusivamente, morte (Vig, 1990; Kaplan, 1968; Novotny *et al.*, 2011).

Dos estudos que foram realizados, é possível verificar que estas substâncias são tóxicas para uma diversa variedade de espécies com funções diferentes nos ecossistemas e na cadeia alimentar e o grau de sensibilidade aos tóxicos difere entre espécies.

### 1.1.2 Constituintes das beatas

Apesar de já se ter conhecimento de que o descarte indiscriminado das beatas apresenta um risco para os organismos e os ecossistemas, pouco é feito para a prevenção da sua distribuição no ambiente e os estudos atualmente disponíveis ainda são poucos. Tais substâncias que vêm tanto dos componentes como da produção do tabaco antes da sua distribuição e consumo.

O cigarro convencional é constituído por duas partes: o tabaco e o filtro enrolados em papel. O filtro do cigarro convencional é normalmente composto por acetato de celulose, um bioplástico produzido pela modificação e substituição dos grupos hidroxilo da estrutura da celulose (proveniente de plantas como fibras de madeira e algodão) com ácido acético e anidrido acético na presença de um catalisador, sendo substituídos por grupos acetilo. Esta modificação permite que o acetato de celulose seja moldado facilmente e funcione como um retardador de chama. O filtro foi inicialmente criado com a intenção de reduzir os riscos associados com o fumar, filtrando as substâncias provenientes do fumo e supostamente proteger o fumador (Geiss e Kotzias, 2007).

Estudos demonstram que o fumo do tabaco é uma mistura complexa, contendo, aproximadamente, 7000 compostos químicos (Hoffmann e Hoffmann, 1998; Thielen *et al.*, 2008; Borgerding e Klus, 2005) e cerca de 50 são carcinogénicos conhecidos (U.S.

[Surgeon General 1983](#); [1984](#); [1986](#); [1989](#)). Estes compostos presentes no fumo podem ficar retidos no filtro enquanto os cigarros são fumados e, aproximadamente, 130 substâncias já foram encontradas ([Gong et al., 2017](#)).

O principal constituinte do tabaco é a nicotina, também estando presente outros compostos como o acetaldeído (composto que amplifica a atividade farmacológica da nicotina), alcatrão, óxidos de nitrogénio (nitratos e amónia), cianeto de hidrogénio, aldeídos voláteis (como acetaldeído, formaldeído), monóxido de carbono ([U.S. Surgeon General, 1984](#); [Hoffmann e Hoffmann, 1998](#)), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), N-nitrosaminas, polónio-210, aminas aromáticas (benzeno, fenol) e também metais ([Moriwaki, 2009](#)) como o arsénico, o cádmio, níquel, zinco ([Menden et al., 1972](#)), entre outros.

Outros compostos, que também se encontram nos filtros, provêm do cultivo e crescimento do tabaco como herbicidas, inseticidas, fungicidas, rodenticidas ([Glantz et al., 1996](#)) e umectantes ([Harris, 2011](#)).

Para além das substâncias presentes, outro motivo de preocupação é a acumulação das beatas no ambiente. O mecanismo principal para a degradação é a deacetilação inicial através da hidrólise química e acetil esterases. A celulose é facilmente biodegradada por microrganismos, contudo, o acetato de celulose é um material plástico cujos níveis de acetato, grande densidade de fibras e inclusão de plastificantes aumenta a eficácia dos filtros, mas torna a sua degradação biológica difícil e lenta ([Rustemeyer, 2004](#); [Araujo e Costa, 2019](#)). Apesar de ser um polímero fotodegradável a comprimentos de onda ultravioleta inferiores a 280nm, a sua degradação é limitada à luz do sol devido à falta de cromóforos para a absorção da radiação. O baixo conteúdo em azoto (N) também poderá ser um fator que precisa de ser superado no ambiente em que se encontra para que uma degradação biológica ocorra mais rapidamente. Caso o ambiente seja pobre em N, como pavimentos e praias arenosas, este talvez não conceda um input exógeno suficiente para atingir a taxa C:N necessária para a decomposição de acordo com Parton *et al.* ([2007](#)).

A decomposição das beatas pode chegar até mais de 10 anos. Bonanomi *et al.* ([2015](#), [2020](#)) fez estudos de longa duração (5 anos) para avaliar a dinâmica e ecotoxicidade da decomposição do acetato de celulose em condições controladas e de campo em dois tipos de solo e com a ausência de solo. A perda de massa das beatas apresentou um padrão: no primeiro mês, houve uma perda de massa inicial significativa (~15-20%) com a degradação da camada de celulose externa. No entanto, ao fim de 5 anos, a decomposição abrandou para ~30-35%. Os ensaios realizados nos dois tipos de solo em incubação no laboratório tiveram uma grande perda de massa, aproximadamente 75 e 85%, enquanto o ensaio sem solo apenas teve 52%. Nos ensaios realizados no campo, os valores de perda de massa foram intermédios devido às condições ambientais e da adição do solo. Quanto aos ensaios sem solo, as beatas permaneceram intactas após 5 anos. Este estudo mostrou que ao fim de dois anos de decomposição, as beatas perderam apenas ~30-40% da sua massa inicial e 50-80% ao fim de 5 anos dependendo do solo e das condições a que se encontravam. Mesmo em condições com disponibilidade suficiente de N, pouco de acetilação ocorreu nas beatas, afetando a decomposição biológica. Apesar de ter havido degradação dos compostos, tanto este como os seus metabolitos podem ainda persistir no ambiente.

### 1.1.3 Lei, sensibilização do público e recolha

Ao constituir uma das maiores formas de poluição, iniciativas já estão a ser tomadas para tentar controlar e diminuir este problema mundialmente, incluindo Portugal.

Em Portugal, a 3 de setembro de 2019, a lei nº 88/2019 foi publicada com o objetivo de reduzir o impacto das beatas de cigarro, charutos e outros cigarros no meio ambiente. A lei aprova medidas para a deposição, recolha e tratamento dos resíduos de produtos de tabaco, assim como medidas de sensibilização e de informação. No artigo nº 9, as empresas produtoras de tabaco devem promover a utilização de materiais biodegradáveis nos filtros de tabaco. Estabelecimentos comerciais (restauração e bebidas), empresas de transportes públicos, edifícios de ocupação não habitacional (instituições de ensino superior, atividade hoteleira, alojamento local) devem dispor aos seus clientes de cinzeiros e de equipamentos para a sua deposição e limpar os resíduos produzidos nas áreas de ocupação (artigo nº4).

Segundo o artigo nº11, o descarte inapropriado de beatas é punível por lei, com coima de 25 a 250 euros para indivíduos e de 250 a 1500 euros a entidades responsáveis caso não coloquem cinzeiros ou fizerem a limpeza dos resíduos.

Campanhas são feitas pelos municípios e organizações de defesa ambiental para encorajar e organizar a recolha e limpeza das beatas nas ruas e nas praias. Algumas cidades já disponibilizam caixotes de lixo próprios distribuídos pelas ruas e existem pequenas empresas que recolhem os resíduos para proceder ao seu tratamento. Assim, as beatas ou são descartadas em aterros ou podem ser recicladas noutros materiais. No entanto, de momento as alternativas aos filtros e o descarte das beatas ainda são limitadas e a iniciativa também depende do esforço do consumidor para não continuar com o descarte indiscriminado. Para análise desta temática tem-se utilizado vários organismos-teste em laboratório, entre eles, *Artemia*.

## 1.2. *Artemia*

### 1.2.1 Taxonomia

Considerando a diversidade de organismos aquáticos que podem ser afetados pela presença das beatas, é importante compreender a forma como estes resíduos afetam os ecossistemas, nomeadamente os ecossistemas marinhos. Para este trabalho o organismo-teste escolhido foi a *Artemia franciscana*.

*Artemia franciscana* pertence ao filo Arthropoda, subfilo Crustacea, class Branchiopoda, ordem Anostraca, família Artemiidae e género *Artemia* (Siebold e Stannius, 1848; Pennant, 1777; Latreille, 1806; Sars, 1867; Grochowski, 1896).

O género foi descrito pela primeira vez por Lymington (Inglaterra) numa publicação atualmente extinta no século XVIII. Em 1758, Linneo identificou a *Artemia* como *Cancer salinus* (Garcia, 2009; López, 2012) e, em 1819, Leach renomeou o organismo como *Artemia salina* (Amat, 1985), este binomen definindo de forma generalizada todas as espécies pertencentes ao género (Hontoria e Amat, 1992).

Desde essa data, várias espécies foram identificadas e, atualmente, o género *Artemia*, também conhecido como brine shrimp, é constituído por seis espécies bissexuais, nomeadamente, *A. franciscana* (Kellogg, 1906), *A. persimilis* (Piccinelli e Prosdociami, 1968), *A. salina* (Leach, 1819), *A. urmiana* (Gunther, 1890), *A. sinica* (Cai, 1989) e *A. tibetiana* (Abatzopoulos et al., 1998); e por várias linhagens partenogénicas obrigatórias (Garcia, 2009; Gajardo et al., 2001; Baxevanis et al., 2006). No entanto, a taxonomia das várias espécies ainda é um tema bastante debatido (Garcia, 2009) e ainda existe muita incerteza quanto às suas relações sistemáticas e filogenéticas (Triantaphyllidis et al., 1997).

A *Artemia* habita ambientes hipersalinos (salinidade até 370ppt), como lagos salgados, lagoas costeiras e salinas solares (Persoone and Sorgeloos 1980), pois tem mecanismos fisiológicos para aguentar o stress osmótico (Gajardo e Beardmore, 2012), sendo que a salinidade é o fator abiótico delimitante principal. Está distribuída por todos os continentes com exceção da Antártica (Triantaphyllidis et al., 1998) e as espécies que se reproduzem por partenogénese não estão distribuídas no continente americano. Apesar de a salinidade ser o fator principal, outros fatores como a temperatura, composição iónica e interações bióticas também influenciam a sua distribuição (Van Stappen, 2002). As diferentes espécies têm em comum a sua adaptabilidade a grandes variações de salinidade (5-250gL<sup>-1</sup>) e de temperatura (6-35°C), com temperatura ótima entre os 20-25°C. Como são organismos filtradores não seletivos, conseguem adaptar-se a diferentes fontes de nutrientes conforme o que está disponível no ambiente. Podem ser encontradas a diversas altitudes desde ao nível do mar até quase 4500m (Xin et al., 1994) e a condições meteorológicas desde húmidas-subhúmidas a áridas (Vanhaecke et al., 1987) e a zonas tropicais, frias ou temperadas (Persoone e Sorgeloos, 1980).

A *Artemia* tem uma grande importância económica na indústria da aquacultura e é usada como alimento para peixes marinhos e espécies de crustáceos, constituindo, aproximadamente, 40% da demanda para alimentação nos estados de desenvolvimento iniciais (Sorgeloos et al., 2001). Normalmente o instar I é o estado de desenvolvimento usado para a alimentação de outros organismos. O instar II apesar de ser maior em tamanho, a sua natação é mais rápida e, ao estarem privados de nutrientes, tornam-se transparentes, não sendo tão eficazes como presa. Para além disso, os quistos secos sem cápsula e a biomassa dos juvenis e adultos também podem ser usados como alimento para algumas espécies de peixe (Dhert et al., 1997; Vanhaecke et al., 1995; Verreth e Den Bieman, 1987).

## 1.2.2 Morfologia externa

*Artemia* consiste de crustáceos pequenos primitivos com um comprimento total de, aproximadamente, 10mm para os machos adultos, 10-12mm para as fêmeas adultas

e, para ambos os sexos, uma largura de 4mm ([Abatzopoulos et al., 2002](#)). As espécies que se reproduzem por partenogénese podem atingir 20 mm de comprimento ([Amat, 1985](#)). O corpo é segmentado com apêndices anexados e está dividido em 3 partes: cabeça, tórax e abdómen (figura 1), sendo possível observar certas diferenças nestas partes entre os sexos.

A cabeça consiste de cinco segmentos metaméricos, cada segmento contendo estruturas diferentes. O primeiro segmento contém dois pedúnculos em cada extremidade onde se encontram os olhos compostos seguido de um segmento com um par de anténulas e de antenas. As fêmeas apresentam as antenas pequenas e filiformes enquanto as dos machos são hipertrofiadas a nível dos exopódios (estruturas descritas na parte do tórax). Quanto aos pedúnculos e olhos, estes podem ser usados para distinguir o sexo do indivíduo, pois, os machos apresentam maior comprimento e largura. Os restantes segmentos contêm o labrum (uma estrutura a cobrir a boca ventral), um par de mandíbulas e um par de maxilas, respetivamente ([Amat, 1985](#)).

O tórax consiste de 11 segmentos, cada um com um par de apêndices articulados: filópodes, estes que apresentam tanto exopoditos usados para a osmorregulação e respiração, como endopoditos usados para a locomoção. O comprimento dos filópodes aumenta desde o primeiro e décimo primeiro segmento em direção ao meio do tórax. Os membros torácicos definem um canal medio-ventral chamado o sulco de comida que tem a função de órgão filtrador. Estruturas nos filópodes, chamadas de espinhas e cerdas (*setae*), aumentam a sua área funcional, melhorando a eficácia da natação e, juntamente com cílios presentes na base do membro, têm funções de filtração da comida ([Amat, 1985](#); [Criel e Macrae, 2002](#)).

Por fim, o abdómen está segmentado em 8. Os primeiros segmentos contêm o pénis e vesícula seminal nos machos ou o saco ovífero e útero nas fêmeas. Não há apêndices anexados do segundo ao sétimo segmento e o oitavo acaba num par de cercópodes (télson) que apresenta dimorfismo ([Amat, 1985](#); [Criel e Macrae, 2002](#)).

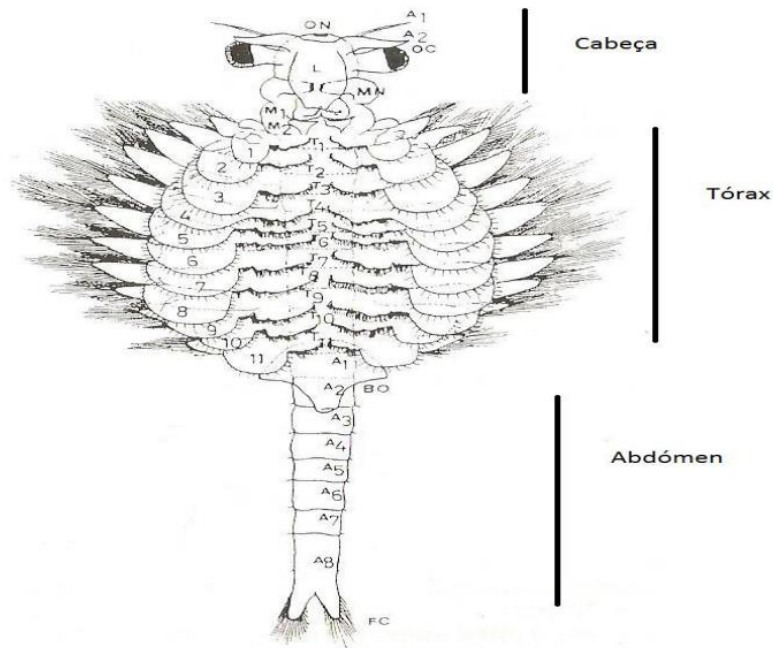


Figura 1. Representação da morfologia externa de *Artemia*, apresentando o corpo dividido em 3 partes: cabeça, tórax e abdómen (adaptado de [Amat, 1985](#)).

### 1.2.3 Morfologia interna

A *Artemia* apresenta uma morfologia interna bastante primitiva e simples. O sistema nervoso consiste de um cérebro dorsal e conetivos circunesofágicos unidos a gânglios segmentais emparelhados que se distribuem por todo o corpo. A hemolinfa é composta por hemócitos com hemoglobina em estado livre, sendo que os hemócitos têm a função de coagulante e reparador ([Lochhead, 1941](#); [Martin et al., 1999](#); [Day et al., 2000](#)). A presença de hemoglobina na hemolinfa (Hb3) e o seu aumento ou perda dependo do baixo ou alto teor de oxigénio dissolvido no meio e é o que permite os organismos sobreviverem em águas salinas (com baixo teor de oxigénio dissolvido). O baixo teor de oxigénio confere à *Artemia* uma cor avermelhada devido às maiores concentrações de hemoglobina. O sistema circulatório é um sistema lacunar aberto e o coração é um tubo longitudinal suspenso dorsalmente que se abre em várias partes, circulando a hemolinfa. Como referido anteriormente, os exopoditos encarregam-se da osmorregulação e respiração e os filópodos assistem na alimentação ao dirigirem algas unicelulares, protozoários e bactérias filtradas à boca. ([Amat, 1985](#); [Criel e Macrae, 2002](#)). A excreção nos organismos adultos efetua-se através dos toracópodos, glândulas maxilares e intestino ([López, 2012](#)).

## 1.2.4 Reprodução e ciclo de vida

A *Artemia* consegue sobreviver apesar das condições ambientais difíceis onde se encontram devido a um conjunto de várias adaptações, uma delas o seu ciclo de vida intercambiável ([Kappas et al., 2004](#)) Apresenta reprodução sexuada e assexuada por partenogénese. Na reprodução por partenogénese a produção de descendência é efetuada apenas pelas fêmeas sem precisar da presença dos machos. Por sua vez, a reprodução sexuada pode ser por oviparidade ou ovoviviparidade dependendo das condições ambientais ([Igarashi, 2008](#)). Quando as condições ambientais são favoráveis com alto teor de oxigénio dissolvido, abundância de alimento e salinidade dentro dos níveis aceitáveis, ocorre a ovoviviparidade: os náuplios desenvolvem-se dentro do saco ovífero da fêmea até ao instar I e, posteriormente, são libertados pelas fêmeas no ambiente. No caso da oviparidade, esta ocorre quando as condições ambientais são desfavoráveis, ou seja, quando há escassez de alimento, baixo teor em oxigénio dissolvido e alta salinidade. O desenvolvimento e metabolismo do embrião são interrompidos (diapausa e criptobiose) durante o estado de gástrula e uma camada espessa segregada pelas glândulas localizadas no útero (glândulas de casca) desenvolve-se em volta do embrião, formando quistos que são libertados pelas fêmeas para o ambiente ([Amat, 1985](#); [Criel e Macrae, 2002](#)). A camada dos quistos é formada por três estruturas que proporcionam diferentes funções de forma a proteger o embrião: o córion, a membrana cuticular externa e membrana cuticular embrionária. O córion protege o embrião contra ruturas mecânicas e radiação ultravioleta dos raios solares; a membrana cuticular externa atua como filtro e protege contra moléculas maiores que as moléculas de CO<sub>2</sub>; e a membrana cuticular embrionária transforma-se em membrana de eclosão durante a incubação (Jean Michel e Jefferson, 2011). Estes quistos podem ser dispersos de forma natural através das ondas, ventos e aves limícolas e de forma artificial na inoculação de quistos nas salinas e que se acumulam e são recolhidos em locais específicos ([Amat, 1985](#); [López, 2012](#)). Os quistos permanecem em estado de latência até o meio voltar a ter condições favoráveis para a eclosão das larvas microscópicas da *Artemia*, os náuplios, cada quisto dando origem a um organismo.

Quer por reprodução sexual quer por partenogénese, os náuplios passam por 18 estados larvares até chegarem ao estado adulto ([Vanhaecke e Persoone, 1984](#)). Quando a eclosão ocorre (1-2 dias no caso dos quistos), o náuplio apresenta-se num primeiro estado de desenvolvimento, o Instar I (figura 2). Neste estado, o náuplio, ainda com um sistema digestivo pouco desenvolvido, não se alimenta e apenas consome as suas próprias reservas ([Benijts et al., 1976](#)). Como os exopoditos só se tornam funcionais com o desenvolvimento larval, meios com baixo teor de oxigénio são prejudiciais para os náuplios. O corpo é principalmente composto pela cabeça e tem presente um par de anténulas, um par de antenas e um par de mandíbulas curtas. Para além disso, já apresenta o labrum a cobrir o ventre (boca) ([Anderson et al., 1967](#)).

Aproximadamente 6-8 horas após a eclosão, os náuplios desenvolvem-se para o Instar II ou metanáuplio ([Sorgeloos et al., 2001](#)). Os metanáuplios têm o dobro do comprimento que em Instar I, o tronco continuando a diferenciar-se nas próximas mudas, e têm uma natação mais eficiente com o desenvolvimento das antenas e das mandíbulas, sendo mais rápidos. Neste estado de desenvolvimento, as larvas são mais translúcidas após consumirem as suas reservas e começam a alimentar-se por filtração ([Anderson et al., 1967](#); [López, 2012](#)).

No Instar III, os náuplios também são chamados de metanáuplios como em Instar II. As larvas continuam a crescer e as pequenas diferenças das antenas e mandíbulas são as características que ajudam a distinguir entre esta fase e Instar II. Esta muda dura até 22-27h após a eclosão ([Anderson et al., 1967](#)).

Com as diferentes mudas, o corpo fica mais segmentado e mais desenvolvido até chegarem ao estado adulto cerca de 3 semanas após a eclosão e começam a gerar descendência. Os indivíduos adultos conseguem sobreviver até 4 meses ([Anderson et al., 1967](#)). As fêmeas reproduzem-se durante toda a sua vida após atingirem a maturidade sexual ([López, 2002](#)). Para a reprodução, os machos unem-se às fêmeas através das suas antenas à frente do útero, permanecendo nessa posição e movendo-se juntos até a fertilização estar completa e o ciclo recomeça.

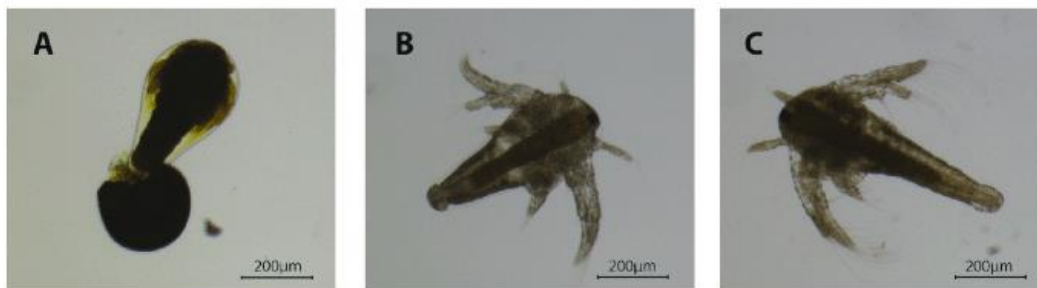


Figura 2. Fotos de três estados de *Artemia franciscana* durante o desenvolvimento: A – Eclosão do quisto; B – Náuplio em Instar I; C – Náuplio em Instar II. ([Lopalco et al., 2019](#))

### 1.2.5 *Artemia franciscana* como modelo toxicológico

*A. franciscana* é uma espécie endêmica do continente americano que começou a distribuir-se em diversas partes do mundo devido à sua comercialização e introdução internacional de salinas ([Mendes, 2014](#); [Amat et al., 2005](#); [Amat et al., 2007](#)) para melhorar a produção de sal e para a colheita de quistos e cultivo dos organismos para a aquacultura. A demanda por quistos de *Artemia* apresenta cerca de 40% da demanda total para a alimentação de estados iniciais de desenvolvimento ([Sorgeloos et al., 2001](#)).

Para além de forma de alimentação para outras espécies, a *Artemia* também é bastante usada em ensaios toxicológicos. Apesar de não ser considerada uma espécie sensível comparada com outras espécies usadas ([Nunes et al., 2006a](#)), a *A. franciscana* é considerada um bom modelo ecotoxicológico pelas seguintes razões ([Nunes et al., 2006a](#); [Manfra et al., 2012](#); [Kokkali et al., 2011](#); [Vanhaecke et al. 1981](#)):

- bom conhecimento da sua biologia e ecologia;
- rápida obtenção e abundância de náuplios (24-72h) apesar de se esperar grande mortalidade durante as fases iniciais da vida em cultivo intensivo;

- disponibilidade de quistos comerciais duráveis que garantem a homogeneidade da população-teste;
- ciclo de vida curto;
- baixo custo de manutenção;
- boa adaptação a diversas condições ambientais/de teste e a nutrientes.

A *Artemia* tem sido usada numa grande variabilidade de testes de toxicidade envolvendo materiais tóxicos como pesticidas ([Barahona e Sánchez-Fortún, 1996](#)), lixiviados ([Svensson et al., 2005](#)), materiais dentários ([Pelka et al., 2000](#)), toxinas fúngicas ([Harwig e Scott, 1971](#)), biocidas anti-incrustantes ([Koutsaftis e Aoyama, 2007](#)) e de iões metálicos ([Kokkali et al., 2001](#)) como arsénio (As) ([Brix et al., 2003](#)), cádmio (Cd) ([Hadjispyrou et al., 2001](#); [Brix et al., 2006](#); [Leis et al., 2014](#); [Kokkali et al., 2001](#)), cobre (Cu) ([Kokkali et al., 2001](#)), cromo (Cr) ([Hadjispyrou et al., 2001](#); [Leis et al., 2014](#)), ferro (Fe) ([Kokkali et al., 2001](#)), mercúrio (Hg) ([Leis et al., 2014](#)), estanho (Sn) ([Hadjispyrou et al., 2001](#)), zinco (Zn) ([Brix et al., 2006](#); [Kokkali et al., 2001](#)).

Esta espécie foi escolhida considerando as vantagens que tem como modelo toxicológico, assim como a sua tolerância e boa adaptação a condições ambientais difíceis quando comparada com outros organismos-teste utilizados em ensaios toxicológicos que são menos adaptados a várias condições abióticas, tanto no ambiente como em laboratório ([Nunes et al., 2006a](#)). Estas vantagens tornam a *A. franciscana* numa espécie interessante para avaliar a toxicidade das beatas e comparar os resultados com a literatura atualmente disponível.

### 1.3. Objetivos

Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos toxicológicos das beatas fumadas (BF) e não fumadas (BNF) de cigarro em náuplios e indivíduos adultos de *A. franciscana* em várias concentrações-teste em ensaios de toxicidade aguda. Pretende-se verificar caso o efeito é o mesmo nas duas fases de desenvolvimento distintas do organismo.

## 2. Materiais e Métodos

Os quistos certificados de *A. franciscana* para este trabalho foram obtidos pela Inve Aquaculture® em Salt Lake City, Utah (EUA) e escolheu-se a espécie de algas *Dunaliella salina* como alimento para os organismos-teste.

O parâmetro escolhido para os ensaios toxicológicos foi a mortalidade, de forma a avaliar os efeitos toxicológicos das beatas de cigarro, tanto nos náuplios como nos indivíduos adultos da *A. franciscana*. A mortalidade foi definida como a ausência de movimento dos organismos, observando-se a cessação da atividade de natação e/ou ausência de movimento dos apêndices.

Para a realização deste trabalho, foi definido um desenho experimental baseado em Manfra *et al.* (2015), fazendo alterações conforme o necessário de acordo com o material disponível no laboratório e as limitações devido às medidas de segurança implementadas para o coronavírus SARS-CoV-2.

### 2.1. Preparação de água salgada artificial

A água salgada artificial (ASW) foi obtida através de uma mistura de água desionizada e de sal marinho (Tropic Marin® Premium Reef-Salt – Germany), mantendo a salinidade a 35PSU. A ASW foi utilizada como controlo e para a realização das diferentes soluções teste, assim como habitat para o organismo teste e alimento enquanto a saturação de oxigénio na água foi mantida a níveis superiores a 60% (Manfra *et al.*, 2015).

### 2.2. Preparação das soluções-teste

As soluções-teste foram preparadas a partir de soluções-stock com 8 beatas fumadas (BF) e 8 beatas não fumadas (BNF) por litro. As beatas de cigarros (Winston® Classic) utilizadas foram fumadas pela mesma pessoa, de forma a controlar a variabilidade e diminuir o risco de contaminação (Slaughter *et al.*, 2011), e armazenadas a temperatura ambiente num recipiente até à sua utilização.

Misturou-se 1L de ASW com as beatas respetivas para cada solução-stock e agitou-se durante 24h com uma placa de agitação magnética (VWR®-VMS-A S40). Após 24h, as soluções foram filtradas com uma bomba de vácuo (VWR®-VCP 80), usando filtros de papel Whatman® Grade 4 e, posteriormente, armazenadas a 4°C (Lee e Lee, 2014). Aplicou-se um fator de diluição 2x das soluções-stock para preparar as soluções-teste, misturando ASW para atingir as concentrações desejadas (8; 4; 2; 1; 0,5 beatas por litro respetivamente). Estas concentrações-teste escolhidas foram baseadas de outros estudos com *A. franciscana* e dos resultados que eram esperados.

### 2.3. Cultura de algas

Um cultivo de algas da espécie *Dunaliella salina* foi utilizado como alimento durante a fase de crescimento dos organismos-teste até atingirem a fase adulta. O sistema de cultivo para as algas foi montado com luz artificial e manteve-se uma oxigenação constante, usando bombas de ar (AirPump AP180) com o tubo plástico conectado a uma pipeta graduada de 10mL. Balões de fundo redondo de 6L foram preenchidos por 4 a 5L de ASW e adicionou-se 10mL de meio Fábregas ([Fábregas et al., 1984](#)) por cada litro de ASW como fonte de nutrientes para as algas.

Quando necessário para evitar o crescimento excessivo das algas que causaria a sua mortalidade e a acumulação de amónia que também afetaria os organismos quando utilizadas, procedia-se à filtragem das algas que apresentavam uma cor verde-escuro. Metade da solução do balão era transferido e adicionava-se ASW para perfazer o volume anterior. Depois adicionava-se meio de Fábregas dependendo do estado das algas.

### 2.4. Ensaio de toxicidade em náuplios de *A. franciscana*

#### 2.4.1 Obtenção dos organismos

Nesta fase do trabalho, 4g de quistos de *A. franciscana* foram colocados num balão volumétrico de 6L contendo 5L de ASW (fonte de luz) e com arejamento, usando uma bomba de ar (AirPump AP160) com o tubo plástico conectado a uma pipeta graduada de 10mL e expostos a uma fonte de luz (1000-4000 lux) durante uma hora. Depois, foram incubados a um fotoperíodo 14h:10h (luz/escuro) e a uma temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48h até eclodirem e atingirem o estado de desenvolvimento II-III desejado para os ensaios toxicológicos com os náuplios (entre 24-72h).

#### 2.4.2 Ensaio de toxicidade (fase larvar)

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de 3mL, uma fonte de luz e uma lupa (Zeiss Stemi DV4), 10 náuplios foram transferidos para cada gobelé de 100mL com 50mL de controlo (ASW) e de soluções-teste preparadas (0,5; 1; 2; 4; 8 beatas por litro). Tapou-se os gobelés parcialmente com parafilme para evitar a contaminação, mas permitindo a passagem de oxigénio. Os gobelés foram mantidos com um fotoperíodo 14h:10h (luz/escuro) durante 96h. Os indivíduos foram observados a cada 24h utilizando a lupa, uma placa de petri e uma pipeta Pasteur de 3mL e a mortalidade foi registada conforme o que foi definido.

### 2.5. Ensaio de toxicidade em indivíduos adultos de *A. franciscana*

#### 2.5.1 Crescimento dos organismos

Para a obtenção dos organismos necessários para o ensaio de toxicidade em indivíduos no estado adulto de *A. franciscana*, procedeu-se ao mesmo procedimento apresentado no ensaio de toxicidade em náuplios seguindo as mesmas condições

(incubação com fotoperíodo 14h:10h (luz/escuro) e arejamento). Os náuplios obtidos após 48h foram transferidos para outro balão de fundo redondo limpo contendo ASW. Para isso, utilizou-se uma fonte de luz para os atrair à superfície e proceder sem transferir quistos juntamente com os náuplios. Eles foram alimentados com 200mL por semana de cultura de algas da espécie *Dunaliella salina* durante aproximadamente 3 semanas (estado adulto) até serem usadas no ensaio de mortalidade.

Durante o processo, teve-se o cuidado de manter o mesmo nível de salinidade da água salgada (35 PSU) assim como manter a água limpa e evitar o excesso de alimento e a acumulação de amónia, acrescentado ou trocando a água quando necessário.

### 2.5.2 Ensaio de toxicidade (fase adulta)

Seguiu-se novamente o mesmo procedimento que no ensaio de mortalidade dos náuplios. Transferiu-se 10 indivíduos adultos para gobelés de 250mL com 100mL das soluções-teste preparadas (0,5; 1; 2; 4; 8 BF e BNF) e controlo, tapando-os parcialmente com parafilme. Os gobelés foram mantidos no escuro a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Foram realizadas 3 réplicas para cada tratamento.

O ensaio teve uma duração de 96h e a mortalidade foi avaliada a cada 24h. Como no ensaio com os náuplios, a mortalidade foi definida como ausência total de movimento após estimulação mecânica.

## 2.6. Análise Estatística:

O tratamento dos dados é efetuado utilizando o software IBM SPSS Statistics 26 com  $p < 0.05$  utilizando uma ANOVA unidirecional e um teste post-hoc Turkey HSD de forma a avaliar as diferenças entre as várias concentrações-teste e controlo dos tratamentos com as beatas fumadas e as não fumadas.

Para os diferentes períodos de observação (24, 42, 72 e 96h), vão ser determinadas as várias concentrações letais dos tratamentos ( $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$ ,  $LC_{50}$ ) através de uma regressão probit.

## 3. Resultados

### 3.1. Toxicidade do lixiviado das beatas fumadas (náuplios)

Na figura 3 está apresentada a curva de concentração-resposta obtida após 96h para os ensaios com os náuplios de *A. franciscana*, assim como o  $LC_{50}$  de, aproximadamente, 1,42 BF/L para a espécie.

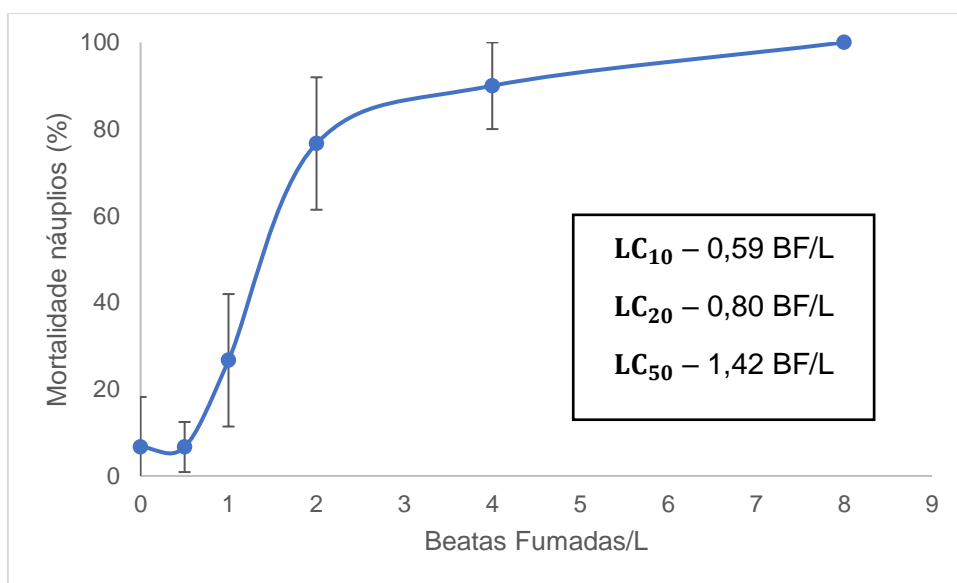


Figura 3. Curva concentração-resposta para os náuplios de *Artemia franciscana* às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 0,59; 0,80 e 1,42 BF/L.

Como podemos observar no gráfico da figura 1, o lixiviado das beatas fumadas foi tóxico para os náuplios, sendo que a concentração testada mais alta (8 BF/L) teve 100% de mortalidade enquanto a concentração mais baixa (0,5 BF/L) apresentou uma mortalidade inferior a 10% (6,67%) (tabela 1). O controlo teve uma sobrevivência superior a 80%, este valor que torna válido os resultados de acordo com Manfra *et al.* (2015).

Tabela 1. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos náuplios de *Artemia franciscana* com as beatas fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h.

Concentração (BF/L)	Mortalidade (nº de indivíduos)			Mortalidade (%)	Desvio-padrão
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
<b>0 (Controlo)</b>	0	2	0	6,67	11,55
<b>0,5</b>	1	0	1	6,67	5,77
<b>1</b>	4	1	3	26,67	15,28
<b>2</b>	8	6	9	76,67	15,28
<b>4</b>	9	8	10	90,00	10,00
<b>8</b>	10	10	10	100,00	0,00

A concentração mais alta de 8 BF/L teve mortalidades mais elevadas desde as primeiras 24h, seguida da concentração de 4 BF/L que aumentou a partir das 48h (figura 4) até chegar a um valor próximo ao fim das 96h. Nas primeiras 48h, todas as concentrações exceto a de 4 BF/L e 8 BF/L mantiveram 0% de mortalidade, começando a aumentar só a partir das 72h. A concentração de 0,5 BF/L manteve-se relativamente baixa até ao fim do ensaio, apenas as médias das três concentrações mais altas ultrapassando os 50% às 96h. Com a realização de uma ANOVA unidirecional e do teste *post-hoc* Tukey HSD, foi possível observar que a concentração mais alta teve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) comparada com o controlo desde as 48h até ao fim do ensaio e as concentrações 2 BF/L e 4 BF/L às 72h.

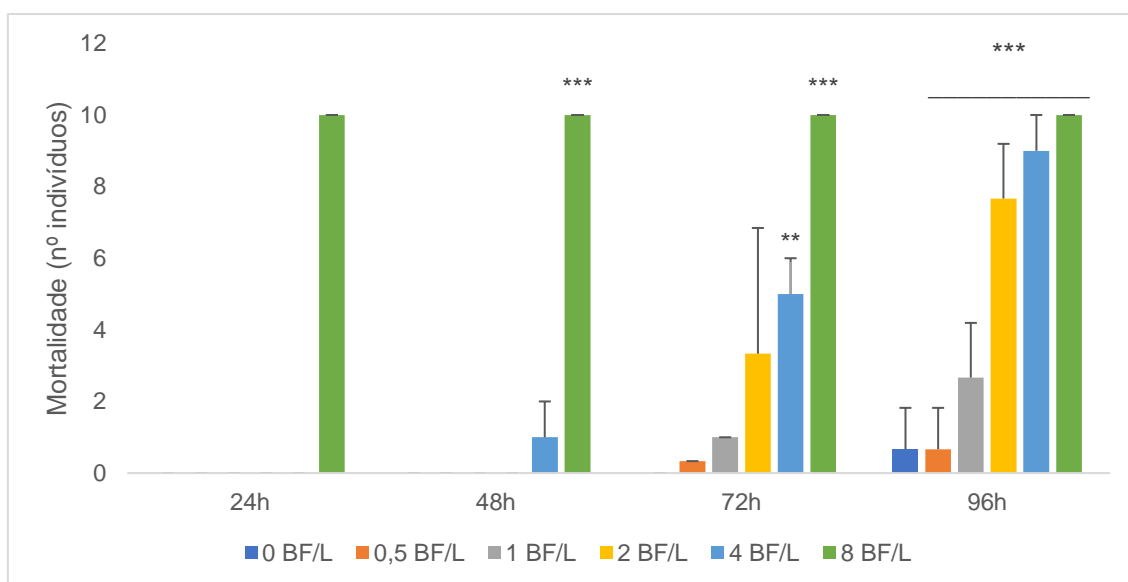


Figura 4. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos náuplios de *Artemia franciscana* durante o ensaio toxicológico (BF). Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). BF – beatas fumadas.

Utilizou-se a regressão probit como método para calcular as diferentes concentrações letais ( $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$ ).

O valor  $LC_{10}$  mais alto observado na tabela 2 foi obtido às 24h enquanto o valor mais baixo foi às 96h, ou seja, às 96h obteve-se a concentração mais baixa para se observar a morte de 10% dos indivíduos. O mesmo pode ser observado tanto para o  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$ , com as concentrações mais altas e as mais baixas correspondendo às 24h e 96h, respetivamente. Para que metade dos indivíduos estejam mortos ao fim de 96h, é apenas necessária uma concentração de 1,4 BF/L.

Tabela 2. Valores obtidos de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  do ensaio realizado nos náuplios de *Artemia franciscana* com beatas fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%).

	24h	48h	72h	96h
<b>LC<sub>10</sub></b> Estimativa 95% (LI-LS)	4,104 (3,336-4,678)	3,856 (2,942-4,501)	1,445 (N.D.-N.D.)	0,594 (0,172-0,975)
<b>LC<sub>20</sub></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	4,533 (3,823-5,127)	4,252 (3,406-4,924)	1,897 (N.D.-N.D.)	0,801 (0,293-1,211)
<b>LC<sub>50</sub></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	5,481 (4,826-6,278)	5,124 (4,370-6,023)	3,192 (N.D.-N.D.)	1,416 (0,795-1,878)

### 3.2. Toxicidade do lixiviado das beatas não fumadas (náuplios)

Em seguida, apresenta-se a curva de concentração-resposta dos náuplios de *A. franciscana* para o ensaio com as beatas não fumadas (BNF) após 96h (figura 5), obtendo-se um  $LC_{50}$  de, aproximadamente, 5,17 BNF/L.

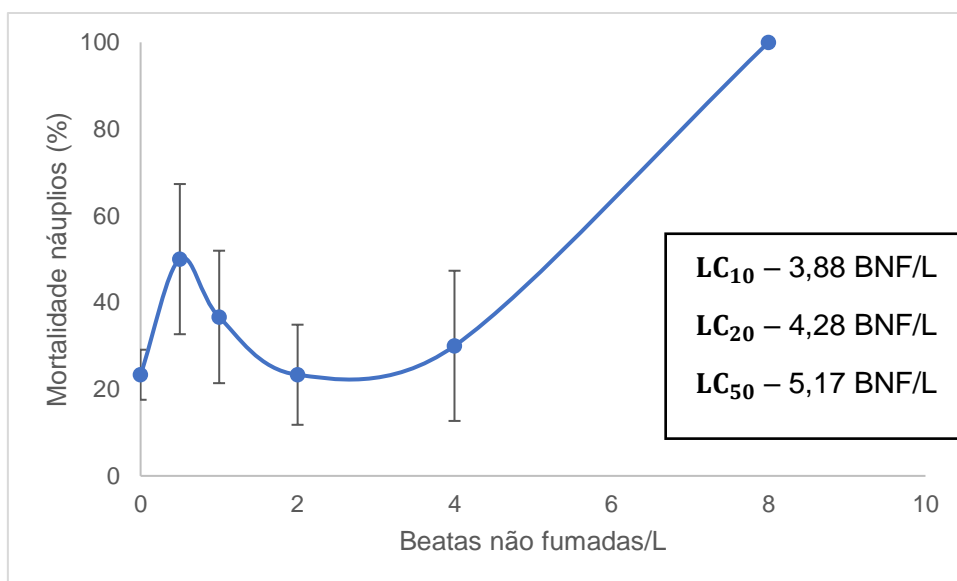


Figura 5. Curva concentração-resposta para os náuplios de *Artemia franciscana* às 96h (beatas não fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub> e LC<sub>50</sub> para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 3,88; 4,28 e 5,17 BF/L.

O lixiviado de beatas não fumadas (BNF) também foi tóxico para os organismos, no entanto, apresentou uma descida dos valores de mortalidade entre 0,5 e 4 BF/L até estes valores voltarem a subir na concentração de 8 BNF/L. Tal como no ensaio com o lixiviado de beatas fumadas, este teve uma mortalidade de 100% na concentração mais elevada (8 BNF/L) enquanto a mais baixa correspondeu à concentração de 2 BNF/L com uma mortalidade de, aproximadamente, 23% igual ao valor do controlo. A sobrevivência do controlo foi, aproximadamente, 80% (tabela 3). Considerou-se que os náuplios ainda não tinham sido alimentados assim como a subida da temperatura quando o ensaio foi realizado. Apesar de a espécie ser resistente, ambos poderão ter afetado a sobrevivência dos náuplios.

Tabela 3. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos náuplios de *Artemia franciscana* com as beatas não fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h.

Concentração (BF/L)	Mortalidade (nº de indivíduos)			Mortalidade (%)	Desvio-padrão
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
<b>0 (Controlo)</b>	3	2	2	23,33	5,8
<b>0,5</b>	6	6	3	50,00	17,3
<b>1</b>	4	5	2	36,67	15,3
<b>2</b>	3	3	1	23,33	11,5
<b>4</b>	4	4	1	30,00	17,3
<b>8</b>	10	10	10	100,00	0,0

A mortalidade para a concentração 8 BNF/L foi 100% desde o primeiro dia como no ensaio do lixiviado das beatas fumadas (figura 6). Com exceção dessa concentração, a mortalidade média das restantes concentrações manteve-se relativamente baixa e

apenas a concentração 0,5 BNF/L chegou aos 50% ao fim das 96h. A concentração mais elevada apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) desde o primeiro dia do ensaio e a concentração 2 BNF/L apenas nas primeiras 24h.

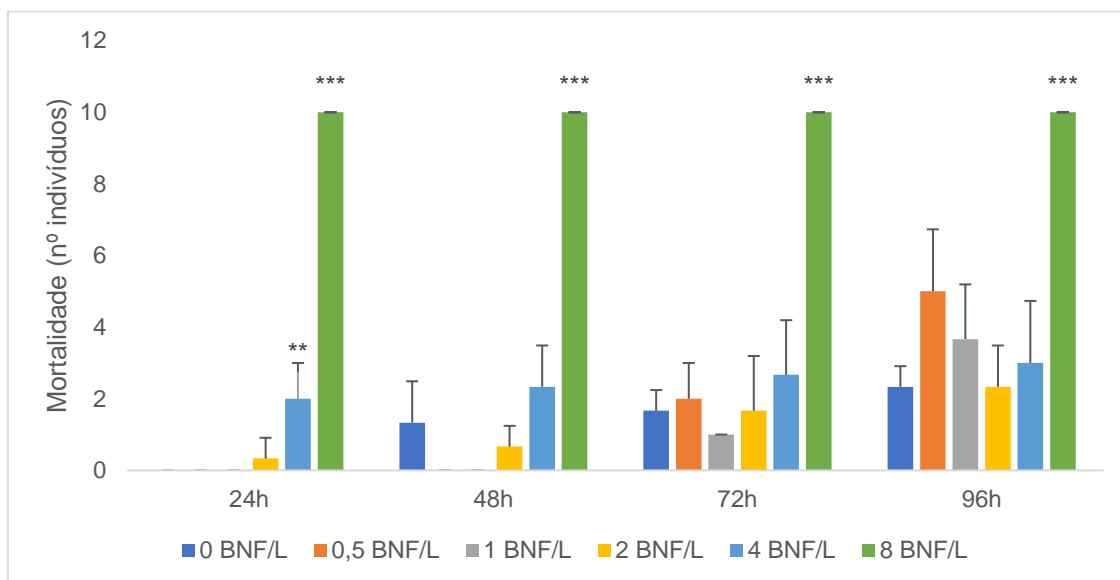


Figura 6. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos náuplios de *Artemia franciscana* durante o ensaio toxicológico (BNF). Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). BNF – beatas não fumadas.

Com uma regressão probit, também se obteve o  $LC_{10}$ , o  $LC_{20}$  e o  $LC_{50}$  (tabela 4). O  $LC_{10}$  mais baixo correspondeu às 72h e o mais alto às 96h, contudo, os valores obtidos em cada dia foram bastante próximos. Para o  $LC_{20}$ , o valor mais baixo foi o das 72h e o mais alto novamente às 96h. Entre as 24h e as 72h os valores de  $LC_{50}$  foram muito próximos e, após as 96h, é necessária uma concentração de 5,2 BNF/L para que haja morte de metade dos indivíduos. Os valores obtidos foram mais altos que os obtidos no ensaio do lixiviado com beatas fumadas.

Tabela 4. Valores obtidos de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  do ensaio realizado nos náuplios de *Artemia franciscana* com beatas não fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%).

	24h	48h	72h	96h
<b><math>LC_{10}</math></b>				
Estimativa	3,599	3,630	3,171	3,884
95% (LI-LS)	(2,821-4,036)	(2,843-4,063)	(1,956-3,866)	(N.D.-N.D.)
<b><math>LC_{20}</math></b>				
Estimativa a	3,960	3,984	3,652	4,285
95% (LI-LS)	(3,337-4,422)	(3,365-4,450)	(2,535-4,326)	(N.D.-N.D.)
<b><math>LC_{50}</math></b>				
Estimativa a	4,756	4,759	4,782	5,172
95% (LI-LS)	(4,262-5,685)	(4,268-5,765)	(3,948-5,662)	(N.D.-N.D.)

### 3.3. Toxicidade do lixiviado das beatas fumadas (indivíduos adultos)

No ensaio do lixiviado das beatas fumadas com os indivíduos adultos da *A. franciscana*, obteve-se a curva concentração-resposta representada na figura 7, para as 96h, e um  $LC_{50}$  de, aproximadamente, 2,75 BF/L.

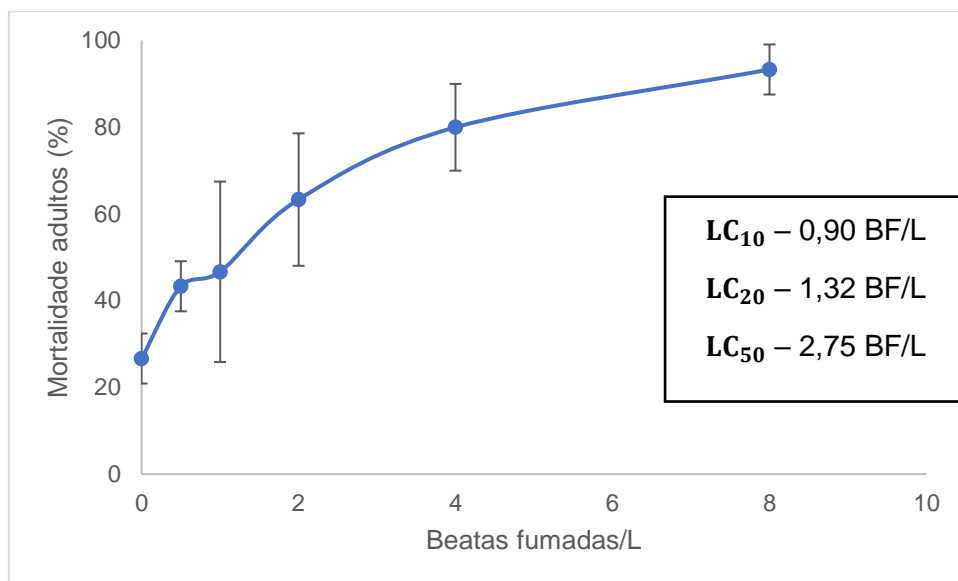


Figura 7. Curva concentração-resposta para os indivíduos adultos de *Artemia franciscana* às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 0,90; 1,32 e 2,75 BF/L.

O lixiviado de beatas fumadas (BF) também mostrou ser tóxico para os indivíduos adultos da espécie. A concentração testada mais alta obteve uma mortalidade de, aproximadamente, 93%, enquanto as duas concentrações mais baixas tiveram uma mortalidade inferior a 50% (43% e 47% para 0,5 e 1 BF/L, respetivamente) (tabela 5). Novamente, a sobrevivência do controlo foi inferior a 80%, portanto considerou-se o mesmo que no ensaio anteriormente indicado.

Tabela 5. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com as beatas fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h.

Concentração (BF/L)	Mortalidade (nº de indivíduos)			Mortalidade (%)	Desvio-padrão
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
<b>0 (Controlo)</b>	0	0	0	26,67	5,8
<b>0,5</b>	1	1	2	43,33	5,8
<b>1</b>	1	0	2	46,67	20,8
<b>2</b>	0	0	2	63,33	15,3
<b>4</b>	1	0	0	80,00	10,0
<b>8</b>	7	4	5	93,33	5,8

Neste ensaio, a mortalidade média da concentração de 8 BF/L manteve-se relativamente mais alta que a das restantes durante as primeiras 72h. A partir das 72h, a mortalidade das concentrações 2 e 4 BF/L tiveram um grande aumento, ultrapassando os 50% (figura 8). Novamente, a concentração mais alta teve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quanto ao controlo e as concentrações 2 e 4 BF/L no último dia do ensaio.

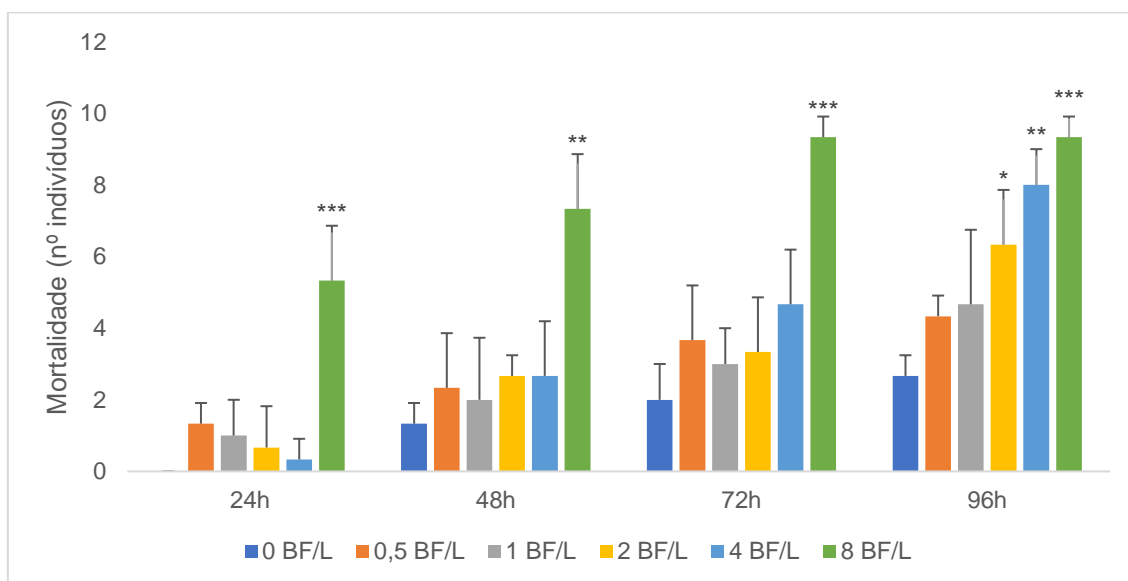


Figura 8. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* durante o ensaio toxicológico (BF). Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). BF – beatas fumadas.

Em todos os valores obtidos de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$ , os valores mais altos foram os das 24h e os mais baixos às 96h (tabela 6). Para que metade dos organismos morram após 24h, é necessária uma concentração relativamente alta, mas, após 96h, a concentração torna-se mais baixa e fixa-se, aproximadamente, nas 2,8 BF/L.

Tabela 6. Valores obtidos de LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub> e LC<sub>50</sub> do ensaio realizado nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com beatas fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%).

	24h	48h	72h	96h
<b>LC<sub>10</sub></b> Estimativa 95% (LI-LS)	4,205 (1,576-5,491)	3,322 (0,157-4,788)	3,388 (1,375-4,472)	0,895 (000,2-2,122)
<b>LC<sub>20</sub></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	5,463 (3,280-7,139)	4,225 (0,558-5,640)	3,923 (1,928-4,983)	1,317 (0,010-2,696)
<b>LC<sub>50</sub></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	9,015 (6,941-22,636)	6,692 (4,433-11,048)	5,191 (3,535-6,377)	2,754 (0,229-4,536)

### 3.4. Toxicidade do lixiviado das beatas não fumadas (indivíduos adultos)

Por fim, obteve-se a curva concentração-resposta apresentada na figura 9, após 96h, para o lixiviado de beatas não fumadas (BNF) no ensaio com os indivíduos adultos com um LC<sub>50</sub> correspondente a 5,05 BNF/L, aproximadamente.

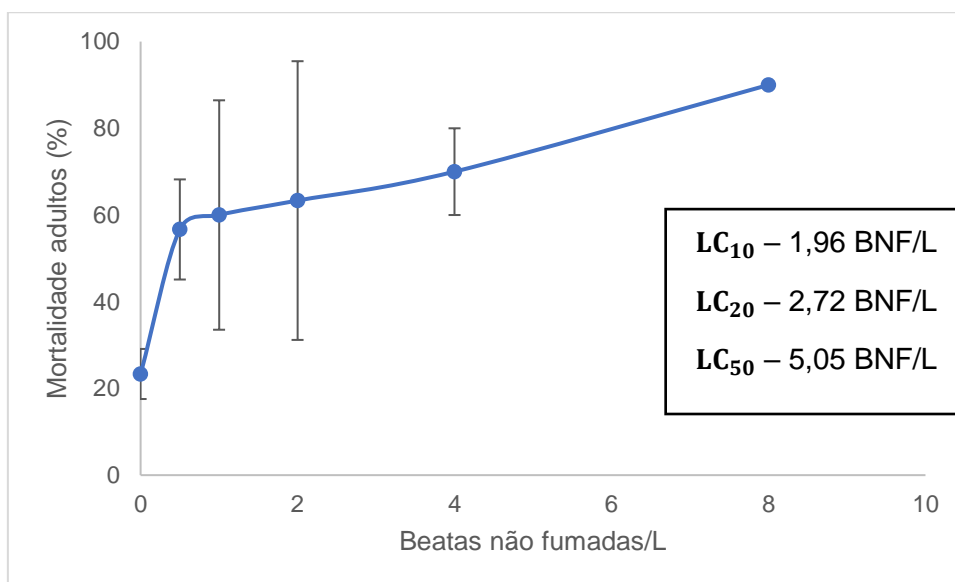


Figura 9. Curva concentração-resposta para os indivíduos adultos de *Artemia franciscana* às 96h (beatas fumadas). No gráfico estão apresentados os valores que representam as médias de mortalidade, em percentagem, e os respetivos desvios-padrão. Os valores de LC<sub>10</sub>, LC<sub>20</sub> e LC<sub>50</sub> para as beatas fumadas às 96h foram os seguintes: 1,96; 2,72 e 5,05 BF/L.

Neste ensaio, o lixiviado também foi tóxico para os indivíduos adultos da espécie, sendo que a concentração mais alta teve 90% de mortalidade ao fim de 96h (tabela 7) e a concentração mais baixa correspondeu a uma mortalidade superior a 50%. Novamente, o controlo teve uma sobrevivência próxima de 80%.

Tabela 7. Valores obtidos para o ensaio de mortalidade dos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com as beatas não fumadas, percentagem de mortalidade e respetivos desvios-padrão às 96h.

Concentração (BF/L)	Mortalidade (nº de indivíduos)			Mortalidade (%)	Desvio-padrão
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
<b>0 (Controlo)</b>	3	2	2	23,33	5,8
<b>0,5</b>	5	7	5	56,67	11,5
<b>1</b>	8	3	7	60,00	26,5
<b>2</b>	10	4	5	63,33	32,1
<b>4</b>	7	6	8	70,00	10,0
<b>8</b>	9	9	9	90,00	0,0

Na figura 10 estão representadas as médias de mortalidade obtidas. Os valores em todas as concentrações aumentaram ao longo do ensaio, ultrapassando os 50% ao fim das 96h. Com exceção da concentração de 8 BNF/L às 24h e 96h ( $p < 0,05$ ), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas comparadas com o controlo.

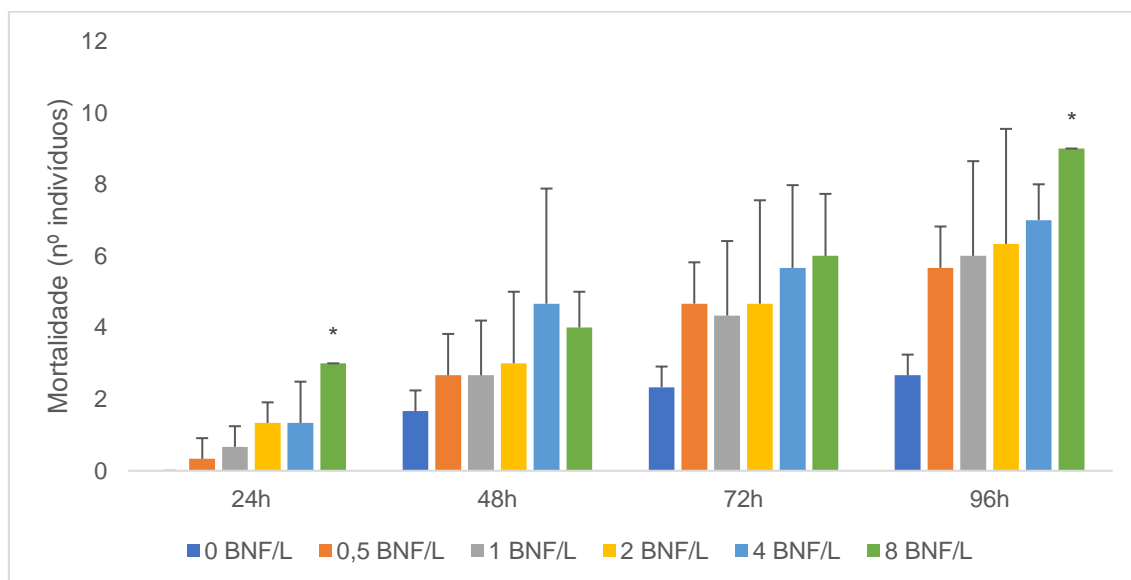


Figura 10. Médias e respetivos desvios-padrão da mortalidade observada nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* durante o ensaio toxicológico (BNF). Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas entre o controlo e as soluções-teste para cada dia de observação com base no teste *post-hoc* Tukey HSD ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). BNF – beatas não fumadas.

O valor mais alto de  $LC_{10}$  foi obtido às 72h enquanto o mais baixo foi obtido às 48h (tabela 8). Para o  $LC_{20}$ , o mais alto correspondeu às 24h e o mais baixo voltou a ser observado às 48h. Já no caso do  $LC_{50}$ , é necessária uma concentração consideravelmente alta para que ocorra mortalidade em 50% dos indivíduos, esta que diminuiu após as 96h do ensaio para, aproximadamente, 5,0 BNF/L.

Tabela 8. Valores obtidos de  $LC_{10}$ ,  $LC_{20}$  e  $LC_{50}$  do ensaio realizado nos indivíduos adultos de *Artemia franciscana* com beatas não fumadas em cada dia de observação. LI – Limite de confiança inferior (95%); LS – Limite de confiança superior (95%).

	24h	48h	72h	96h
<b><math>LC_{10}</math></b> Estimativa 95% (LI-LS)	2,032 (N.D.-N.D.)	0,054 (N.D.-N.D.)	2,143 (N.D.-N.D.)	1,965 (N.D.-N.D.)
<b><math>LC_{20}</math></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	5,038 (N.D.-N.D.)	0,450 (N.D.-N.D.)	4,524 (N.D.-N.D.)	2,717 (N.D.-N.D.)
<b><math>LC_{50}</math></b> Estimativa a 95% (LI-LS)	28,624 (N.D.-N.D.)	25,943 (N.D.-N.D.)	18,896 (N.D.-N.D.)	5,047 (N.D.-N.D.)

## 4. Discussão

Todos os resultados obtidos indicaram que tanto o lixiviado de beatas fumadas como o das não fumadas foram tóxicas para ambas as fases de desenvolvimento, resultados que eram esperados. O  $LC_{50}$  obtido no ensaio com o lixiviado de beatas fumadas usado nos náuplios foi mais baixo que o obtido no ensaio com o lixiviado de beatas não fumadas (1,42 BF/L e 5,17 BNF/L), indicando que o das beatas fumadas foi mais tóxico. O mesmo pode ser observado entre os valores de  $LC_{50}$  obtidos no ensaio com os indivíduos adultos (2,75 BF/L e 5,05 BNF/L). Apesar de ter havido uma diferença entre os  $LC_{50}$  dos lixiviados de beatas fumadas nos ensaios com os náuplios e os indivíduos adultos (1,42 BF/L e 2,75 BF/L), os  $LC_{50}$  dos lixiviados de beatas não fumadas tiveram valores próximos (5,17 BF/L e 5,05 BNF/L). Ainda que os valores obtidos dos lixiviados de beatas não fumadas neste trabalho serem menos tóxicos e de terem uma diferença considerável comparados com os das beatas fumadas, a mortalidade ao fim de 96h foi elevada.

Register (2000) indicou num estudo que o lixiviado de tabaco fumado era muito tóxico para a espécie *Daphnia magna*, 1,0-2,0 BF/L às 48h. No entanto, nos ensaios com os lixiviados de beatas fumadas, ambas as fases de desenvolvimento (náuplios e adultos) obtiveram concentrações mais altas, nomeadamente, 5,124 BF/L nos náuplios e 6,691 BF/L nos indivíduos adultos. Estes valores mostraram que *A. franciscana* foi mais tolerante aos lixiviados que a *D. magna*.

Na tabela 9 estão apresentados vários  $LC_{50}$  de diferentes espécies obtidos de estudos realizados por Register (2000), Slaughter *et al.* (2001) e Warne *et al.* (2002). De acordo com os valores obtidos dos lixiviados de beatas fumadas, os náuplios de *A. franciscana* foram menos tolerantes apenas comparando com *Atherinops affinis* e *Pimephales promelas*. A fase adulta mostrou ser uma das mais tolerantes, apenas não sendo superior ao  $EC_{50}$  de *C. dubia*. Quanto aos lixiviados de beatas não fumadas, tanto os náuplios como os indivíduos adultos de *A. franciscana* mostraram ser mais tolerantes apenas comparando com *C. dubia*, as restantes espécies tendo valores superiores com exceção de *A. affinis* que teve um  $LC_{50}$  semelhante.

Tabela 9. Valores de  $LC_{50}$  em várias espécies ao fim de 96h. BF/L – beatas fumadas por litro; BNF – beatas não fumadas por litro; (\*48h).

Espécies	BF/L	BNF/L
<i>Daphnia magna</i>	1,0-2,0*	>16
<i>Atherinops affinis</i>	1,8 (1,5-2,0)	5,1 (4,6-5,7)
<i>Pimephales promelas</i>	4,3 (3,7-5,1)	13,5 (11,4-15,9)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> ( $EC_{50}$ )	0,16 (0,09-0,27)	1,7 (1,4-2,1)
<i>Artemia franciscana</i> (náuplios)	1,42	5,17
<i>Artemia franciscana</i> (adultos)	2,75	5,05

É necessário considerar que as espécies apresentadas nesta tabela são, na maioria, espécies de água doce. Apenas *A. affinis* é uma espécie de água salgada igual a *A. franciscana* e foi a única com valores de  $LC_{50}$  próximos dos valores obtidos do

organismo-teste. Com esta comparação, é possível verificar que o facto de a espécie ser de água doce ou salgada poderá ser um fator que influencia a letalidade do lixiviado nas espécies.

O motivo da *A. franciscana* ser mais tolerante comparada com outras espécies ainda é desconhecido, mas pode ser devido a diferenças metabólicas entre as espécies (Slaughter *et al.*, 2011; Moerman *et al.*, 2011).

Trabalhos realizados sobre esta temática com *A. franciscana* são, de momento, escassos, mas estes apontam para a sua grande toxicidade em pouco tempo. O aumento da toxicidade dos lixiviados das beatas não fumadas para os lixiviados das beatas fumadas deste trabalho está de acordo com os estudos publicados.

Comparando os resultados do ensaio envolvendo os náuplios com outros estudos sobre o efeito dos lixiviados de beatas fumadas e não fumadas na fase larvar da *A. franciscana*, os  $LC_{50}$  obtidos neste trabalho foram diferentes. Em Silva A. (2019), a concentração de  $LC_{50}$  para as beatas fumadas foi, aproximadamente, 2,6 BF/L. O  $LC_{50}$  das beatas fumadas foi mais alto que o obtido neste trabalho (1,42 BF/L), sendo que o valor está mais aproximado do que se obteve no ensaio com os indivíduos adultos. Para os resultados do ensaio com a fase adulta, estes podem ser comparados com um estudo realizado por Pinto T (2021) e Pereira B (2021) com o lixiviado de beatas fumadas na *A. franciscana.*, em que o  $LC_{50}$  (2,19 BF/L) foi próximo do obtido neste trabalho (2,75 BF/L).

De acordo com os resultados de Silva A (2019), Pinto T (2021) e Pereira B (2021), a mortalidade nas concentrações das beatas fumadas no estado mais prematuro de desenvolvimento, ou seja, nos náuplios, foi mais alta que a das concentrações nos indivíduos adultos, o que pode indicar que a fase adulta da *A. franciscana* poderá ser mais tolerante ao lixiviado, resultado que também é demonstrado neste trabalho.

Nas beatas podemos encontrar uma grande variedade de compostos que ficam retidos nos filtros quando fumadas e que podem ser lixiviados para o meio aquático e que estudos já demonstraram a toxicidade que podem apresentar no organismo-teste deste trabalho. Estes mesmos compostos também podem estar presentes nos filtros sem os cigarros serem fumados e, por isso, apresentam também uma grande toxicidade. Entre os componentes presentes podemos encontrar vários metais pesados, PAHs, pesticidas e herbicidas, alguns que estão apresentados na tabela 10 com diferentes valores de  $LC_{50}$  para *A. franciscana*.

Tabela 10. Sumário de  $LC_{50}$  em *Artemia franciscana* de vários compostos em mg/L.

Composto	24h $LC_{50}$
Cadmium chloride (mg/L Cd)	155.5
Dibutyltin diacetate (mg/L Sn)	89.4
Dimethyltin dichloride (mg/L Sn)	80.7
Potassium dichromate (mg/L Cr)	4.77
Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos	>18
Eucalyptos major (flowers)	762
DCMU (Diuron) (herbicida)	12,5
nTiO2	28
Benzalkonium chloride	32000

---

Carvão ativado

>1000

---

*Artemia* spp. são consideradas um grupo de organismos pouco sensíveis aos metais devido a possuírem estratégias para a destoxificação de metais como vias metabólicas de cálcio e acumulação no exosqueleto de grânulos de fosfato e, posteriormente, a sua excreção por via de mudas (Wang, 2002; Rainbow et al., 2006). O organismo é resistente ao cádmio (Cd) comparado com outras espécies (tabela 10), sendo que o valor de LC<sub>50</sub> atinge 4 ordens de magnitude mais elevada para *Daphnia magna* (Kungolos e Aoyama, 1993). *A. franciscana* também apresenta certa resistência para o estanho (Sn), contudo, Hadjispyrou (2001) demonstrou que o organismo é particularmente sensível ao crómio (Cr), em que o dicromato de potássio tem o LC<sub>50</sub> mais tóxico dos metais indicados (2,77 mg/L Cr). No entanto, os valores apresentados na tabela 10 são apenas para as primeiras 24h, estes podendo ser consideravelmente diferentes a uma exposição mais prolongada.

Resíduos de pesticidas provenientes do processo de produção de tabaco foram encontrados no fumo num estudo utilizando três dos tipos de tabaco mais utilizados nos cigarros comerciais, burley, bright e oriental (Dane et al., 2006). Os três pesticidas encontrados (flumetralin, trifluralin e pendimethalin) são suspeitos de serem disruptores endócrinos que causam efeitos adversos no desenvolvimento, reprodução e processos hormonais nos organismos (Wattiez, 2004; Rawlings et al., 1998; Hurley et al., 1998) e possíveis carcinogénicos para o ser humano (U.S. EPA, 2001). Aditivos também são bastante usados na indústria do tabaco, alguns que já se mostraram ser carcinogénicos em animais (National Toxicology Program, 2000; Wiseman et al., 1987).

Como a *Artemia* é resistente a muitos dos compostos presentes nas beatas, a sua elevada mortalidade a concentrações baixas e a capacidade de os compostos se bioacumularem no ambiente causa preocupação para os ecossistemas e para as espécies que possuem maior sensibilidade. Apesar de haver evidências da toxicidade das beatas de cigarro em vários organismos, a relação entre estes e a forma como os compostos interagem nos sistemas aquáticos, assim como o metabolismo diferente dos organismos, é bastante complexa, tornando-se difícil avaliar o verdadeiro risco que a sua contaminação pode apresentar.

## 5. Conclusão

Com a realização deste trabalho, foi possível verificar que as beatas de cigarro, tanto fumadas como não fumadas, são bastante tóxicas para a espécie escolhida, *A. franciscana*. Os resultados obtidos vão de acordo com os estudos publicados quanto à maior toxicidade dos lixiviados de beatas fumadas quando comparados com os lixiviados das beatas não fumadas. Também se pode concluir que a fase de desenvolvimento da *A. franciscana* (e muito provável a de outras espécies) tem influência na toxicidade das beatas de cigarro, apresentando maior tolerância durante a fase adulta aos compostos presentes. No entanto, como os valores de  $LC_{50}$  dos lixiviados de beatas não fumadas obtidos neste trabalho foram próximos, poderá ter havido influência de certos fatores (aumento de temperatura e falta de alimento) que poderão ter causado a debilitação e menor sobrevivência dos organismos durante a realização dos ensaios e menor resistência aos lixiviados. O método utilizado para a obtenção das concentrações letais também poderá não ter sido o mais adequado devido a alguns dos resultados terem ficado como N.D. Seria necessária a realização de mais ensaios com as condições mais controladas e aumento do número de indivíduos usados em cada ensaio ou do número de réplicas.

Considerando que o estudo foi realizado em laboratório e em apenas 96h, os riscos que apresentam nos meios aquáticos poderão ser subestimados. Não só poderão estar presentes em maiores concentrações, como as beatas e os seus metabolitos podem persistir durante anos, dependendo das condições ambientais do local, afetando as espécies mais sensíveis aos compostos tóxicos.

Seria necessário a realização de estudos mais aprofundados sobre esta temática e explorar se certos fatores podem influenciar a toxicidade das beatas, tais como a temperatura, a salinidade, a presença de alimento e se existe uma diferença em termos de sensibilidade entre as espécies de água doce e água salgada. É importante ter maior conhecimento sobre o impacto que esta forma de lixo tão comum e com tamanha distribuição mundial pode ter.

## 6. Referências bibliográficas

Abatzopoulos TJ, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P (2002). *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 286 pp.

Abatzopoulos TJ, Kappas I, Bossier P, Sorgeloos P, Beardmore JA (2008). Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (Crustacea: Anostraca). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75(3): 333–344.

Abatzopoulos TJ, Zhang B, Sorgeloos P (1998). International study on *Artemia*. LIX. *Artemia tibetiana* preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's republic of China). *International Journal of Salt Lake Research*, 7: 41–44.

Amat F (1985). *Biologia de Artemia*. Informes Tecnicos del Instituto Investigaciones Pesqueras 126-127: 3-60.

Amat F, Hontoria F, Ruiz O, Green AJ, Sánchez MI, Figuerola J, Hortas F (2005). The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, 7: 37-47.

Amat F, Hontoria, F Navarro JC, Vieira N, Mura G (2007). Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, 26 (2): 387-404.

Anderson DT (1967). Larval development and segment formation in the branchiopod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* L. (Anostraca), *Australian Journal of Zoology*, 15: 47-91.

Araujo MCB, Costa MF (2019). A critical review of the issue of cigarette butt pollution in coastal environments. *Environmental Research*, 172: 137–149.

Ariza E, Jimenez JA, Sarda R (2008). Seasonal evolution of beach waste and litter during the bathing season on the Catalan coast. *Waste Manag.* 28: 2604-2613.

Barahona MV, Sánchez-Fortún S (1996). Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 271-278.

Barnes RL (2011). Regulating the disposal of CB as toxic hazardous waste. *Tabac Control.* 20 (Suppl. 1): i45-i48.

- Bator RJ, Bryan AD, Schultz WP (2011). Who gives a hoot?: intercept surveys of litterers and disposers. *Environ. Behav.* 43: 295-315.
- Baxevanis AD, Kappas I and Abatzopoulos TJ (2006). Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. – *Mol. Phylogenet. Evol.* 40: 724–738.
- Benavente MJ, Caballero MJA, Silvero G, López-Coca I, Escobar VG (2018). Cellulose Acetate Recovery from Cigarette Butts. *Proceedings*, 2(20): 1447.
- Benijts F, Vanvoorden E, Sorgeloos P (1976). Changes in the biochemical composition of the early larvalstages of the brine shrimp, *Artemia salina* L. In: Persoone G, Jaspers E Eds., *Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology. Research in Mariculture at Laboratory and Pilot Scale*, vol.1. Universa Press, Wetteren, pp. 1–9.
- Dhert P, Lim LC, Candreva P, Van Duffel H, Sorgeloos P (1997). Possible applications of modern fishlarviculture technology to ornamental fish production. *Aquarium Sci. Conserv.* 1: 119–128.
- Bonanomi G, Incerti G, Cesarano G, Gaglione SA, Lanzotti V (2015). Cigarette Butt Decomposition and Associated Chemical Changes Assessed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR. *PLOS ONE*, 10(1): e0117393.
- Bonanomi G, Maisto G, De Marco A, Cesarano G, Zotti M, Mazzei P, Libralato G, Staropoli A, Siciliano A, De Filippis F, La Storia A, Piccolo A, Vinale F, Crasto A, Guida M, Ercolini D, Incerti G (2020). The fate of cigarette butts in different environments: decay rate, chemical changes and ecotoxicity revealed by a 5-years decomposition experiment. *Environmental Pollution*, 261: 114108.
- Borgerding M, Klus H(2005). Analysis of complex mixtures—cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57: 43-73.
- Brix KV, Cardwell RD, Adams WJ (2003). Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 169–175.
- Brix KV, Gerdes RM, Adams WJ, Grosell M (2006). Effect of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 580–583.
- Cai Y (1989). A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). *The Wasmann Journal of Biology*, 47: 105–110.

Criel GRJ, Macrae TH (2002). *Artemia* Morphology and Structure. *Artemia: Basic and Applied Biology*, 1–37 pp.

Dan S, Oshiro M, Ashidate M, Hamasaki K (2016). Starvation of *Artemia* in larval rearing water affects post-larval survival and morphology of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Brachyura, Portunidae). *Aquaculture*, 452: 407–415.

Dane AJ, Havey CD, Voorhees KJ (2006). The Detection of Nitro Pesticides in Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Using Electron Monochromator-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(10): 3227–3233.

Day R, Criel GRJ, Walling MA, MacRae TH (2000). Posttranslationally modified tubulins and microtubule organization in hemocytes of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Journal of Morphology*, 244: 153–166.

Dieng H, Rajasaygar S, Ahmad AH, Ahmad H, Rawi CSM, Zuharah WF, Satho T, Miake F, Fukumitsu Y, Saad AR, Ghani IA, Vargas REM, Majid AHAM, AbuBakar S (2013). Turning cigarette butt waste into an alternative control tool against an insecticide-resistant mosquito vector. *Acta Trop*, 128(3): 584–590.

Menden EE, Elia VJ, Michael LW (1972). Distribution of cadmium and nickel of tobacco during cigarette smoking. *Environ. Sci. Technol.* 6(9): 830-832.

Fabregas J, Abalde J, Herrero C, Cabezas B, Veiga M (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42(3-4): 207–215.

Gajardo G, Beardmore JA, Sorgeloos P (2001). International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity*, 87(2): 172-7.

Gajardo GM, Beardmore J (2012). The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. *Front. Phys.* 3:1-8.

Garcia JM (2009). Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Sevilha, 142 pp.

Glantz SA, Slade J, Bero LA, Hanauer P, Barnes DE (1996). *The Cigarette Papers*. Berkeley, CA: University of California Press, 202–35.

- Gong M, Khurshid S, Poppendieck D (2017). What's in a butt? Environmental contamination from airborne cigarette butt emissions. *Integr. Environ. Assess Manag*, 13: 549–551.
- Gunther, R.T., 1890. Crustacea. Em: Gunther RT (ed) Contributions to the Natural History of Lake Urmi, N.W. Persia and its Neighbourhood. *Journal of the Linnean Society (Zoology)* 27: 394–398.
- Hadjispyrou S, Kungolos A, Anagnostopoulos A (2001). Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin: cadmium and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 179–186.
- Harris B (2011). The intractable cigarette 'filter problem'. *Tob Control*, 20(Supp 1): i9-i15.
- Harwig J, Scott PM (1971). Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 21: 1011-1016.
- Hoffmann D, Hoffmann I (1998). Letters to the editor, tobacco smoke components. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 18: 49-52.
- Hontoria, F. & Amat, F., 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research*, 14 (7): 949-959.
- Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ (1998). *Environ. Health Perspect.* 106: 437-445.
- Igarashi MA (2008). Potencial econômico das Artêmias produzidas em regiões salineiras do Rio Grande do Norte. *PUBVET, Londrina*, v.2, n.31, Art. 386.
- Iryani MTM, MacRae TH, Sorgeloos P, Muhammad TST, Danish-Daniel M, Tan MP, Satyantini WH, Wahid E, Sun J, Aijun L, Yeong YS (2020). RNA interference of Hsp70 in *Artemia franciscana* nauplii and its effect on morphology, growth, survival and immune response. *Aquaculture*, 520: 735012.
- Joly FX, Coulis M (2018). Comparison of cellulose vs. plastic cigarette filter decomposition under distinct disposal environments. *Waste Management*, 72: 349–353.
- Kadir AA, Sarani NA (2015). Cigarette butts pollution and environmental impact - A review. *Appl. Mech. Mater.* 773: 1106-1110.
- Kaplan B. Acute nicotine poisoning in a dog (1968). *Vet Med Small Anim Clin.* 63(11): 1033-4.

Kappas I, Abatzopoulos TJ, Van Hoa N, Sorgeloos P, Beardmore JA (2004). Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Marine Biology*, 146(1): 103–117.

Kellogg VA (1906). A new *Artemia* and its life conditions. *Science*, 24: 594–596.

Kokkali V, Katramados I, Newman JD (2011). Monitoring the Effect of Metal Ions on the Mobility of *Artemia salina* Nauplii. *Biosensors*, 1(2): 36–45.

Korobushkin DI, Garibian PG, Pelgunova LA, Zaitsev AS (2020). The earthworm species *Eisenia fetida* accelerates the decomposition rate of cigarette butts on the soil surface. *Soil Biology and Biochemistry*, 151: 108022.

Koutsaftis A, Aoyama I (2007). Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci. Total Envir.* 387: 166-174.

Kungolos A, Aoyama I (1993). Interaction effect, food effect and bioaccumulation of cadmium and chromium for the system *Daphnia magna* - *Chlorella ellipsoidea*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 351-369.

Leach WE (1819). Entomostraca, Dictionaire des Science Naturelles, 14: 524.

Lee W, Lee CC (2015). Developmental toxicity of cigarette butts – An underdeveloped issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 362–368.

Leis M, Manfra L, Taddia L, Chicca M, Trentini P, Savorelli F (2014). A comparative toxicity study between an autochthonous *Artemia* and a non native invasive species. *Ecotoxicology* 23(6), 1143–1145.

Lochhead JH (1941). *Artemia*, The “brine shrimp”. *Turttox News* 19: 41-44.

Lopalco P, Lobasso S, Lopes-Dos-Santos RMA, Stappen GV, Corcelli A (2019). Lipid Profile Changes During the Development of *Artemia franciscana*, From Cysts to the First Two Naupliar Stages. *Frontiers in Physiology*, 9.

López GRM (2012). El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Valência, 257 pp.

Manfra L, Savorelli F, Di Lorenzo B, Libralato G, Comin S, Conti D, Floris B, Francese M, Gallo ML, Gartner I, Guida M, Leoni T, Marino G, Martelli F, Palazzi D, Prato E, Righini

- P, Rossi E, Volpi Ghirardini A, Migliore L (2015). Intercalibration of ecotoxicity testing protocols with *Artemia franciscana*. *Ecological Indicators*, 57: 41-47.
- Manfra L, Savorelli F, Pisapia M, Magaletti E, Cicero AM (2012). Long-term lethal toxicity test with the crustacean *Artemia franciscana*. *JoVE*, 62: 2182–2185.
- Manfra L, Canepa S, Piazza V, Faimali M (2016). Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123: 60–64.
- Martin GG, Lin HMJ, Luc C (1999). Reexamination of hemocytes in brine shrimp (Crustacea, Branchiopoda), *Journal of Morphology*, 242: 283–294.
- Mendes PFF (2014). Influência do Cádmiu nas Populações de *Artemia* em Portugal Thesis. Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto.
- Micevska T, Warne MSJ, Pablo F, Patra R (2006) Variation in, and causes of, toxicity of cigarette butts to a cladoceran and microtox. *Arch Environ Con Tox*, 50: 205–212.
- Moerman JW, Potts GE (2011). Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tobacco Control*, 20(Suppl 1), i30-i35.
- 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: 1192–7.
- Murugan K, Suresh U, Panneerselvam C, Rajaganesh R, Roni M, Aziz AT, Hwang JS, Sathishkumar K, Rajasekar A, Kumar S, Alarfaj AA, Higuchi A, Benelli G (2017). Managing wastes as green resources: Cigarette buttsynthesized pesticides are highly toxic to malaria vectors with little impact on predatory copepods. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 10456–10470.
- National Toxicology Program (2000). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyleugenol (CAS No. 93-15-12) in F344/N. Rats and B6C3F1 Mice (GaVage Studies); NTP Technical Report 491; Research Triangle Park, NC, pp 7-9.
- Novotny TE, Hardin SN, Hovda LR, Novotny DJ, McLean MK, Khan S (2011). Tobacco and cigarette butt consumption in humans and animals. *Tob. Control* 20 (Suppl 1), i17–20.
- Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Van Stappen G (2006a). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ. Pollut.* 144: 453–462.

Geiss O, Kotzias D (2007). Tobacco, cigarettes and cigarette smoke: an overview, Institute for 55 Health and Consumer Protection, Editor.

Parker TT, Rayburn J (2017). A comparison of electronic and traditional cigarette butt leachate on the development of *Xenopus laevis* embryos. Toxicology reports, 4: 77–82.

Parton W, Silver WL, Burke IC, Grassens L, Harmon ME, Currie WS, King JY, Adair EC, Brandt LA, Hart SC, Fasth B (2007). Global-Scale Similarities in Nitrogen Release Patterns During Long-Term Decomposition. Science, 315(5810): 361–364.

Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt AA (2000). New screening test for toxicity testing of dental materials. J. Dentistry, 28: 341-345.

Pereira B (2021). Efeito da toxicidade do lixiviado de beatas na mortalidade de *Artemia franciscana*. (Relatório de Estágio). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto.

Persoone G, Sorgeloos P (1980) General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: Persoone G, Sorgeloos P, Roles OA, Jaspers E (eds) The brine shrimp *Artemia*, vol 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa, Wetteren, pp 3–24.

Piccinelli M, Prosdocimi T (1968). Descrizione tassonomica delle due species *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n. sp. Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Letter, Rendiconti B, 102: 170–179.

Pinto T (2021). Efeito da toxicidade do lixiviado de beatas na mortalidade de *Artemia franciscana*. (Relatório de Estágio Extracurricular). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto.

Plastics Europe (2019). Seabin, a New Kind of Floating Bin. Plastics Le Mag – Innovation and Plastics Magazine. Website: <http://plastics-themag.com/Seabin-a-new-kind-of-floating-bin>. Acedido em junho 2021.

Rainbow PS (1997). Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuar. Coastal Shelf Sci. 44(2):169–175.

Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig DJ (1998). Toxicol. Environ. Health, Part A. 54: 21-36

Register K (2000). Cigarette butts as litter – toxic as well as ugly? Bull. Am. Littoral Soc. 25, 23–29.

- Rosas E, Flávio Martins, Janeiro J (2021). Marine Litter on the Coast of the Algarve: Main Sources and Distribution Using a Modeling Approach. *J. Mar. Sci. Eng.* 9(4): 412.
- Rustemeyer P (2004). Cellulose acetates: properties and applications. *Macromol Symp* 208: 240.
- Schultz PW, Large LB, Tabanico J, Bruni C, Bator R (2009). Littering Behavior in America: Results of a National Study. Action Research/Keep America Beautiful, San Marcos, CA.
- Silva ASM (2019). Avaliação da toxicidade do Lixiviado de Beatas em *Artemia franciscana*. (Relatório de Estágio). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto.
- Slaughter E, Gersberg RM, Watanabe K, Rudolph J, Stransky C, Novotny TE (2011). Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. *Tobacco Control*, 20(Suppl 1): i25–i29.
- Sorgeloos P, Dhert P, Candreva P (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200(1-2): 147–159.
- Sousa C (2019). Toxicidade do Lixiviado de Beatas em *Raphidocelis subcapitata* report. Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto.
- Svensson B, Mathiasson L, Mårtensson L, Bergström S (2005). *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environ. Monit. Assess.* 102: 309-321.
- Thielen A, Klus H, Muller L (2008). Tobacco smoke: unraveling a controversial subject. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60: 141-156.
- Triantaphyllidis GV, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P (1998) Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *J Biogeogr.* 25: 213–226.
- Triantaphyllidis G, Criel GR, Abatzopoulos TJ, Thomas KM, Peleman J, Beardmore JA, Sorgeloos P (1997). International study on *Artemia*: 57. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Mar. Biol.* 129: 477-487.
- U.S. EPA (2001). Notice of filing pesticide petitions to establish a tolerance for certain pesticide chemicals in or on food; Fed. Regist. 66: 15459-15468.

U.S. Surgeon General (1986). The health consequences of smoking: nicotine addiction. Washington: U.S. Govt. Printing Office, 1–639.

U.S. Surgeon General (1985). Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. Washington: U.S. Govt. Printing Office, 1–703.

U.S. Surgeon General (1983). The health consequences of smoking: cardiovascular disease. Washington: U.S. Govt. Printing Office, 1–639.

U.S. Surgeon General (1984). The health consequences of smoking: chronic obstructive lung disease. Washington: U.S. Govt. Printing Office, 1–545.

Valiente R, Escobar F, Pearce J, Bilal U, Franco M, Sureda X (2020). Estimating and mapping cigarette butt littering in urban environments: a GIS approach. *Env. Res.* 183: 109142.

Vanhaecke P, De Vrieze L, Tackaert W, Sorgeloos P (1995). The use of decapsulated cysts of the brine shrimp *Artemia salina* as direct food for carp *Cyprinus carpio* larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 21: 257–262.

Vanhaecke P, Persoone G (1984). The ARC-test: A standardized short-term routine toxicity test with *Artemia* nauplii. Methodology and evaluation. *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, Persoone G, Jaspers E, Claus C, Eds, State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research, Ghent, Belgium. v2: 143.

Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5: 382-387.

Vanhaecke P, Tackaert W, Sorgeloos P (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. *Artemia* research and its applications, Vol. 1. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology (ed. by P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Decler and E. Jaspers). Universa Press, pp 129–155.

Van Stappen G (2002). Zoogeography. In: Abatzopoulos TJ, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P (eds) *Artemia: basic and applied biology*. Kluwer, Dordrecht, pp 171–224.

Verreth J, Den Bieman H (1987). Quantitative feed requirements of the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell fed with decapsulated cysts of *Artemia*: I. Effect of temperature and feeding level. *Aquaculture*. 63: 251.

Vig MM (1990). Nicotine poisoning in a dog. *Vet Hum Toxicol.* 32(6): 573-5.

Wang WX (2002). Interactions of trace metals and different marine food chains. Mar. Ecol. Prog. Ser. 243: 295–309.

Warne MStJ, Patra RW, Cole B (2002). Toxicity and a Hazard Assessment of Cigarette Butts to Aquatic Organisms. Interact 2002-Programme and Abstract Book. Sydney: The Royal Australian Society Chemical Institute, The Australasian Society of Ecotoxicology and The International Chemometrics Society: 192.

Wattiez C, Veillerette F (2004). Pestic News, 65: 11

Wiseman RW, Miller EC, Miller JA, Liem A (1987). Structure activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice. Cancer Res. 47: 2275-2283

Xin N, Sun, J, Zhang B, Triantaphyllidis GV, Van Stappen G, Sorgeloos P (1994). International study on *Artemia*. LI. New survey of *Artemia* resources in the People's Republic of China. Int. J. Salt Lake Res. 3: 105–112.