

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE SISTEMAS

AMANDA RIBEIRO ROSA

**Avaliação do efeito de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) na resposta imune inespecífica do marisco branco *Amarillodesma mactroides* (Reeve, 1854)**

São Paulo - SP

2021

AMANDA RIBEIRO ROSA

**Avaliação do efeito de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) na resposta imune inespecífica do marisco branco *Amarillodesma mactroides* (Reeve, 1854)**

Dissertação apresentada ao Programa de Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Jose Roberto Machado Cunha da Silva

São Paulo - SP

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ribeiro Rosa, Amanda  
Avaliação do efeito de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) na resposta imune inespecífica do marisco branco *Amarillodesma mactroides* (Reeve, 1854) / Amanda Ribeiro Rosa; orientador Jose Roberto Machado Cunha da Silva; coorientador Luis Fernando Marques Santos. -- São Paulo, 2021.  
64 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Nanopartículas. 2. Dióxido de titânio. 3. *Amarillodesma mactroides*. 4. Sistema imune. 5. Ecotoxicologia. I. Machado Cunha da Silva, Jose Roberto, orientador. II. Marques Santos, Luis Fernando, coorientador. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidata: Amanda Ribeiro Rosa

Título da Dissertação/Tese: Avaliação do efeito de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) na resposta imune inespecífica do marisco branco *Amarillodesma mactroides* (Reeve, 1854)

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de Mestrado/  
Tese de Doutorado em sessão pública realizada a \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_, considerou  
o candidato:

( ) Aprovado ( ) Reprovado

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente : Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

# COMPROVANTE DE ISENÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Campus Universitário "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB 81 - 05508-908  
Comitê de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7723 - e-mail: cep@icbusp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **947/2018** referente ao projeto intitulado: **"Resposta imune inespecífica em bivalves mesodesma mactroides (Deshayes, 1854) e o efeito agudo da fração solúvel do petróleo (FSA)"** sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro Rosa** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **José Roberto Machado Cunha da Silva**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 10 de abril de 2018.

  
Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

  
Prof. Dra. **Camilla Squarzonni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP



Cidade Universitária "Aramário de Salas Olivares" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2410 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone: (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP-042.2019 (ERRATA)

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP-ICB nº 947/2018, de 10/04/2018, e por solicitação da Prof. Dr. *José Roberto Machado Cunha da Silva*, do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, informo que o título do projeto da aluna *Amanda Ribeiro Rosa* foi alterado para "*Efeito agudo de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) na resposta imune inespecífica do marisco branco Mesodesma mactroides (Deshayes, 1854)*", com pequena alteração de metodologia, com adição da quantificação da proteína HSP70.

São Paulo, 10 de junho de 2019.

Prof. Dra. **Camila Squarzon Dale**  
Coordenadora CEP-ICB/USP

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Ao serzinho cujo coração bate tão acelerado dentro de mim,  
e que ainda sei tão pouco a respeito. Dedico este trabalho  
como um dos meus muitos esforços para fazer a minha  
parte na construção de um mundo melhor.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Luisa e Sergio Luiz, por todo apoio e afeto, desde o início até agora. Por me acompanharem nas aventuras de busca de mariscos, por me levarem à USP aos finais de semana, muitas vezes a noite, porque precisava cuidar dos animais. Pelo contínuo interesse sobre o andamento da minha pesquisa. Por escutarem minhas inúmeras reclamações e me acolherem nos momentos de frustração. Enfim, por estarem sempre presentes, ao meu lado. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida. O meu muito obrigada eterno!

Aos meus irmãos, Rafael e Mariana, que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Jose Roberto Machado Cunha da Silva, meu orientador, agradeço muito a oportunidade de ter aberto as portas do seu laboratório para mim e pela confiança.

Ao Prof. Luís Fernando Marques Santos, meu co-orientador e professor. Como foi importante e gratificante te conhecer. Eu te agradeço imensamente por todo o conhecimento compartilhado, pelas inspirações, por, mesmo em tempos difíceis, não deixar de se dedicar, ensinar, tirar dúvidas, aconselhar, ou às vezes, só escutar e acolher. Você é muito querido. Só tenho a agradecer, e a me desculpar por ter sido a pessoa mais mal-humorada da face da Terra na semana de treinamento Pré Antártico.

À Prof. Ilaria Corsi, que mesmo sem conhecer pessoalmente, foi a base desse estudo. Pela sua experiência, orientações e fornecimentos das nanopartículas, obrigada!

À Elisa Bergami, que também, sem nos conhecermos pessoalmente, foi parte essencial no desenvolvimento do trabalho, que, com seu conhecimento e técnica, foi imprescindível na caracterização das nanopartículas na água do mar.

À Marília Cerqueira Leite Seelaender, que foi quem me indicou o laboratório onde passei muitos bons momentos, conheci pessoas incríveis e mudou completamente a minha vida.

Às três pessoas que fizeram a total diferença no desenvolvimento deste trabalho. Andrews Krupinski Emerenciano, Willian Reina Joviano e Letícia Palmeira Pinto. Sem vocês, eu não teria conseguido. Além de colegas de laboratório, são amigos que levarei para a vida. Eu não esquecerei as noites divertidíssimas no laboratório rodando experimentos. Foi a melhor época!

Ao Andrews, pelo seu conhecimento, por, a qualquer momento, seja do mestrado ou da vida, estar disposto a ajudar. Desde o início não me deixando desistir, até os últimos minutos



deste trabalho, me esclarecendo dúvidas por WhatsApp. Como é bom ter você como amigo para todas as horas. Obrigada!

Ao Will, que esteve presente, em praticamente, 100% do desenvolvimento deste trabalho. Desde as nossas aventuras na coleta, a as outras aventuras no laboratório, independente da hora, da data comemorativa, você estava lá. Obrigada pela maior paciência em todas as explicações e repetições de experimentos. Foi muito bom passar por tudo ao seu lado.

À Letícia, minha querida amiga, minha companheira de nanopartículas. Esteve presente tanto no laboratório, quanto nas casas onde morei. Quebrando a cabeça nos relatórios, e aprendendo e crescendo junto comigo no mestrado e na vida!

Ao Felipe da Costa Souza, meu querido amigo! Apesar de não ser do laboratório, como você é importante na minha vida! Esteve sempre presente, mesmo quando distante fisicamente. Obrigada por todas as ajudas técnicas do trabalho, porém te agradeço muito mais pelas palavras amigas e confortadoras, e pelos abraços que juntavam os pedaços. Você traz paz à minha vida. Traz também a pessoa amada!

Ao Lucas Suntack Azevedo, meu companheiro de vida, que enfrenta todo o tipo de adversidades ao meu lado, muito obrigada! Agradeço pelo grande interesse na minha pesquisa, e, inclusive, pelas ajudas práticas. Agradeço ao apoio, a não me deixar desmoronar. E agradeço acima de tudo, por correr atrás de sonhos ao meu lado. Seguimos, porque temos grandes desafios ainda pela frente.

À Camila Felix de Lima Fernandes, obrigada amiga! Você foi essencial na fase final do trabalho. Mesmo que as coisas não tenham saído como eu gostaria, sou muito grata por você se disponibilizar, mesmo com pouca disponibilidade de tempo, para me ajudar. Te admiro muito.

À Viviane Rosa de Oliveira que também me acompanhou, me acolheu, e esteve comigo nas frustradas tentativas do Western Blotting. Obrigada por sempre se colocar à disposição e ajudar.

À Camila Lima Neves, que também foi importante na fase final do trabalho. Mesmo não podendo fazer o experimento junto, me deu o suporte à distância. Obrigada e desculpa ser tão insistente.

À Cecília Gallottini de Magalhães, agradeço a amizade, a torcida e o acolhimento no seu laboratório sempre que precisei.

À Marlene, que sempre me ajudou no que eu precisei, e sempre com um sorriso estampado no rosto.

Ao pessoal da Base do IO de Cananéia, pela hospedagem e todo apoio.

Ao pessoal do Cebimar, pelo constante fornecimento de água do mar.

Ao pescador Chingó de Ilha Comprida, que tanto me ajudou nas coletas dos mariscos. Sem ele, jamais conseguiria coletar mariscos de maneira tão rápida e eficiente.

À Isabella Bourdon e pessoal do laboratório de Laboratório de Análises Química e Ambiental do IPEN que me ajudaram com a análise de Titânio na água do mar.

À Flávia Saldanha-Corrêa e ao Banco de Microorganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) por sempre me receber tão bem e me ajudar com o fornecimento de microalgas para alimentar os meus mariscos.

Ao Juan Jethro Silva Santos, que, mesmo sem nos conhecermos pessoalmente, tanto me ajudou com as informações referentes à manutenção dos mariscos em laboratório, e que hoje, vejo como um amigo. Obrigada!

À CAPES pela bolsa concedida durante dois anos, e que me permitiu dedicação integral durante este período.

À FAPESP por ter o apoio e suporte proporcionado a mim e ao laboratório no processo 2018/14086-8.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desse momento, **MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A ampla utilização de nanopartículas manufaturadas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) em inúmeros produtos de consumo humano, e sua conseqüente liberação em ecossistemas marinhos, pode representar um risco significativo para organismos aquáticos. Por isso, a avaliação de seu impacto biológico é de grande importância. Os invertebrados filtradores que se alimentam de suspensão, como os moluscos bivalves, representam um grupo-alvo único para a ecotoxicologia, e quando se trata de uma espécie de importância gastronômica, o seu estudo é ainda mais importante, pois ajuda, também, na compreensão da potencial transferência de nanopartículas por magnificação trófica. No presente estudo, o marisco branco (*Amarillodesma mactroides*) foi escolhido por ser um bivalve com importância gastronômica, amplamente distribuído nas praias do Brasil, Uruguai e Argentina e possuir características que podem bioindicar alterações da qualidade ambiental de onde vivem. Este trabalho teve como objetivo estudar parâmetros da imunidade inata destes animais, por meio da caracterização e contagem diferencial dos hemócitos, e investigar os efeitos agudos da exposição *in vitro* e *in vivo* de nano-TiO<sub>2</sub> na imunidade celular destes animais. Na exposição *in vivo*, os mariscos vivos foram expostos à nano-TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L durante 24 e 96 horas, e posteriormente foram realizados testes para a contagem total de hemócitos; e avaliação da capacidade germicida. Na exposição *in vitro*, os hemócitos foram expostos diretamente às soluções de água do mar com nano-TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 5 µg/mL por 1 hora seguindo-se de averiguação da capacidade fagocítica dos hemócitos. Na caracterização e contagem diferencial dos hemócitos foi possível observar duas subpopulações celulares: granulócitos, e hialinócitos, sendo os granulócitos o tipo celular prevalente. A capacidade fagocítica mensurada para esta espécie foi de 41% (± 0,03). Os resultados dos testes de toxicidade com nano-TiO<sub>2</sub> demonstraram diminuição significativa na porcentagem de hemócitos vivos após 24h de exposição a 1 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub>, porém não em 96 h. Para os demais parâmetros, não foram observados efeitos imunotóxicos das concentrações testadas de nano-TiO<sub>2</sub> tanto nas exposições *in vivo*, como nas *in vitro*. O presente trabalho contribui com a expansão do conhecimento existente sobre imunidade bivalve e imunotoxicologia das NPs para uma espécie diferente das comumente utilizadas em estudos similares com nano-TiO<sub>2</sub>. São necessários estudos adicionais para aprofundar e consolidar a investigação sobre o efeito das nano-TiO<sub>2</sub> sobre o sistema imune do marisco branco.

Palavras chave: Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO<sub>2</sub>). *Amarillobesma mactroides*. Sistema Imune.

Aluna: Amanda Ribeiro Rosa

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

# ABSTRACT

The widespread use of manufactured titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO<sub>2</sub>) in numerous products for human consumption, causes their consequent release into marine ecosystems. As this may pose a significant risk to aquatic organisms, the evaluation of its biological impact is of great importance. Suspension-feeding invertebrates such as bivalve mollusks represent a unique target group for ecotoxicology. When it comes to a species of gastronomic uses it becomes an even more important question, as it also helps us understanding the potential transfer of nanoparticles by trophic magnification. In the present study, the yellow clam (*Amarillodesma mactroides*) was chosen as a model because it is an economically important bivalve, widely distributed on the beaches of Brazil, Uruguay and Argentina and has characteristics that can indicate changes in the environmental quality of where they live. This work aimed to evaluate parameters of the innate immunity of these animals, through the characterization and differential count of hemocytes, investigating the acute effects of nano-TiO<sub>2</sub> exposure both *in vitro* and *in vivo*. For the *in vivo* assay, live clams were exposed to nano-TiO<sub>2</sub> at concentrations of 0.01; 0.1 and 1 mg/L for 24 and 96 hours, followed by total hemocyte count and evaluation of their germicidal capacity. For the *in vitro* assay, hemocytes were directly exposed to seawater with nano-TiO<sub>2</sub>, at concentrations of 0.001; 0.01; 0.1; 1 and 5 µg/mL for 1 hour, followed by an investigation of the phagocytic capacity of the hemocytes. During the characterization and differential count of hemocytes it was possible to observe two cellular subpopulations: granulocytes, making up a greater percentage of the total cells, and hyalinocytes. The phagocytic capacity measured for this specie was 41% (± 0.03). The results of the toxicity tests demonstrated a significant decrease in the percentage of alive hemocytes after 24 hours of exposure to 1 mg/L of nano-TiO<sub>2</sub>, but not after 96 hours. No immunotoxic effects was observed with the tested concentrations of nano-TiO<sub>2</sub> after the exposures, both *in vivo* and *in vitro*. The present work contributes to expand the existing knowledge regarding bivalve immunity and NP immunotoxicology, using a different species from those commonly used in similar studies with nano-TiO<sub>2</sub>. Additional studies are needed to further investigate and consolidate the impact of nano-TiO<sub>2</sub> on the immune system of yellow clams.

Keywords: Titanium Dioxide Nanoparticles (nano-TiO<sub>2</sub>). *Amarillodesma mactroides*. Imune system.

Candidate: Amanda Ribeiro Rosa

Mentor: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de localização da Ilha Comprida, São Paulo, Brasil.....	28
Figura 2- Aquários dos grupos controles e de exposição imediatamente antes do primeiro experimento em 24 h após exposição às nano-TiO <sub>2</sub> .....	34
Figura 3 - Medição dos exemplares de <i>A. mactroides</i> antes da coleta da hemolinfa para a realização dos ensaios de capacidade germicida. ....	35
Figura 4 - Hemócitos do <i>A. mactroides</i> . ....	39
Figura 5 - Células de <i>A. mactroides</i> coradas com Rosenfeld sob microscopia de contraste de fase onde é possível visualizar o processo de fagocitose. ....	40
Figura 6- Comparação do comportamento de aglomeração da nano-TiO <sub>2</sub> (5 µg/mL) em FSW e água Milli-Q®. ....	41
Figura 7- Comportamento de agregação da nano-TiO <sub>2</sub> (5µg/mL) em FSW em relação ao tempo. ....	41
Figura 8 - Porcentagem de hemócitos vivos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 24 h de exposição. ....	43
Figura 9 - Porcentagem de hemócitos vivos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 96 h de exposição.. ....	44
Figura 10- Viabilidade celular após 24 h de exposição a diferentes concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> . . ....	44
Figura 11 - Viabilidade celular após 96 h de exposição a diferentes concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> .. ....	45
Figura 12- Efeito da retirada do sedimento na concentração de hemócitos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 24 h. ....	46
Figura 13- Efeito da retirada do sedimento na concentração de hemócitos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 96 h. ....	46
Figura 14 - Efeito da nano-TiO <sub>2</sub> na concentração de hemócitos após 24 h de exposição.....	47
Figura 15 - Efeito da nano-TiO <sub>2</sub> na concentração de hemócitos após 96 h de exposição.....	47
Figura 16- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose comparando-se o controle com sedimento (CS) e o controle sem sedimento (SS) em 24 h. ....	48
Figura 17- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose comparando-se o controle com sedimento (CS) e o controle sem sedimento (SS) em 96 h. ....	48

Figura 18 - Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose nas diferentes concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> , em 24 h após exposição.....	49
Figura 19- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose nas diferentes concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> , em 96h após exposição.....	49
Figura 20- Porcentagem de células que realizaram fagocitose nas diferentes concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> após 1 h de exposição.....	50



# LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos Experimentais .....	34
Tabela 2- Contagem diferencial de hemócitos de <i>A. mactroides</i> .....	39
Tabela 3- Dados da análise DLS, mostrando as diferenças de tamanho em nm ( <i>Z-average</i> ), o índice de polidispersidade (PDI) e potencial $\zeta$ (mV) das nano-TiO <sub>2</sub> (5 $\mu\text{g/mL}$ ) em FSW e água Milli-Q®. ....	42
Tabela 4- Análise da quantidade de titânio total das amostras de água do mar utilizadas nos experimentos.....	42

# LISTA DE ABREVIATURAS

ACD-B	Anticoagulante Ácido Citrato Dextrose – Solução B
CDH	Contagem Diferencial de Hemócitos
CEBIMar	Centro de Biologia Marinha da USP
CTH	Contagem Total de Hemócitos
DSL	Dispersão de Luz Dinâmica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA-PI	Solução de Diacetato de Fluoresceína e Iodeto de Propídeo
FSW	Água do mar filtrada
HE	Técnica de Coloração com Hematoxilina e Eosina
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IPEN-USP	Instituto de Pesquisas Nucleares - USP
ME	Mobilidade Eletroforética
Milli-Q®	Água Ultrapura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nano-TiO <sub>2</sub>	Nanopartículas de Dióxido de Titânio
NSW	Água do Mar Natural
PDI	Índice de Polidispersão
<i>Z-average</i>	Tamanho Médio Hidrodinâmico das Nanopartículas
ζ-potencial	Potencial Zeta

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Poluição Marinha .....	20
1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO <sub>2</sub> ) .....	20
1.3 Bioindicadores.....	22
1.4 Bivalves como bioindicadores para os efeitos das NPs .....	23
1.4.1 Sistema Imune de Bivalves.....	25
1.5 <i>Amarillodesma mactroides</i> .....	26
2 OBJETIVO GERAL .....	26
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Coleta dos Animais .....	27
3.2 Manutenção dos Animais em Laboratório .....	28
3.3 Caracterização da imunidade Celular de <i>Amarillodesma mactroides</i> .....	29
3.3.1 Caracterização/Identificação dos Hemócitos .....	29
3.3.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH) .....	29
3.3.3 Teste de Viabilidade Fúngica .....	30
3.3.4 Ensaio de Fagocitose .....	30
3.4 Avaliação do efeito agudo da nano-TiO <sub>2</sub> na imunidade de <i>A. mactroides</i> .....	31
3.4.1 Caracterização da nano-TiO <sub>2</sub> .....	31
3.4.2 Exposição <i>in vivo</i> .....	32
3.4.2.1 Análise da Água do Mar .....	32
3.4.2.2 Preparação da nano-TiO <sub>2</sub> .....	33
3.4.2.3 Testes de Toxicidade .....	33
3.4.2.4 Análise de sobrevivência.....	35
3.4.2.5 Teste de Viabilidade Celular e Contagem Total de Hemócitos (CTH) .....	35
3.4.2.6 Ensaio para avaliação da capacidade germicida .....	36
3.4.3 Exposição <i>in vitro</i> .....	36
3.4.3.1 Concentrações de nano-TiO <sub>2</sub> .....	36
3.4.3.2 Ensaio de fagocitose.....	37
3.5 Análise Estatística .....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Caracterização da imunidade Celular de <i>Amarillodesma mactroides</i> .....	38

4.1.1 Caracterização/Identificação dos Hemócitos .....	38
4.1.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH) .....	39
4.1.3 Avaliação da Capacidade Fagocítica .....	39
4.2 Avaliação do efeito agudo das nano-TiO <sub>2</sub> na imunidade de <i>A. mactroides</i> .....	40
4.2.1 Caracterização das nano-TiO <sub>2</sub> .....	40
4.2.2 Exposição <i>in vivo</i> .....	42
4.2.2.1 Análise de titânio na água do mar .....	42
4.2.2.2 Testes de toxicidade.....	42
4.2.2.2.1 Análise de sobrevivência.....	43
4.2.2.2.2 Viabilidade celular .....	43
4.2.2.2.3 Efeito da exposição às nano-TiO <sub>2</sub> na concentração total de hemócitos .....	45
4.2.2.2.4 Efeito da nano-TiO <sub>2</sub> na capacidade germicida .....	47
4.2.3 Exposição <i>in vitro</i> .....	49
5 DISCUSSÃO .....	51
5.1 Parâmetros da Imunidade Inata Celular de <i>Amarillodema mactroides</i> .....	51
5.1.1 Hemócitos .....	51
5.1.2 Capacidade Fagocítica.....	51
5.2 Efeito agudo das nano-TiO <sub>2</sub> na imunidade de <i>A. mactroides</i> .....	52
5.2.1 Caracterização da nano-TiO <sub>2</sub> .....	52
5.2.1.1 Análise de Titânio na Água do Mar .....	53
5.2.2 Exposição <i>in vivo</i> .....	54
5.2.3 Exposição <i>in vitro</i> .....	55
6 CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Poluição Marinha

As atividades humanas já são responsáveis por um grande declínio da diversidade biológica no mundo. O aumento populacional e da urbanização de zonas costeiras ameaçam à vida marinha de diferentes formas: superexploração de recursos, despejo de lixo, poluição, introdução de espécies exóticas, aterramento marítimo, dragagem, além, de mudanças climáticas (DERRAIK, 2002; PRIYA *et al.*, 2021).

Em relação à poluição, esta pode ser definida como: qualquer substância ou energia natural ou de origem humana que é introduzida no meio ambiente pelos humanos que apresenta efeito prejudicial sobre os organismos vivos e os ambientes naturais (UNEP, 1982).

Os ambientes marinhos estão expostos a diferentes tipos de poluentes antrópicos que podem ser gerados por atividades industriais, domésticas e agrícolas (HEWITT; ANDERSON; THRUSH, 2005, HAMZA-CHAFFAI, 2014).

A poluição marinha prejudica os organismos em toda a cadeia alimentar de diversas maneiras, dependendo da fonte. Metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (POPs) podem causar danos fisiológicos e alterar comportamentos. Luzes artificiais ao longo da costa à noite podem interromper a navegação do organismo, predação e migração vertical. Poluentes farmacêuticos, como drogas anticoncepcionais, pode prejudicar a reprodução e, inclusive, ocasionar mudanças de sexo em espécies de peixes. E há também os poluentes que têm a capacidade de bioacumulação, ou seja, que tem sua concentração aumentada quanto mais alto o nível trófico da espécie (WILLIS *et al.*, 2021).

Com o avanço da tecnologia, novas demandas de materiais estão surgindo, o que implica no aparecimento de novas fontes antrópicas de contaminação ambiental, os impactos dessas novas fontes no meio ambiente marinho ainda são desconhecidos (MEARNS *et al.*, 2015; WILLIS *et al.*, 2021).

## 1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>)

Em meados do século XX, foi apresentado o conceito básico de nanotecnologia: tipo de tecnologia que manipula átomos ou moléculas possibilitando transformá-los em estruturas com geometria e propriedades desejadas (SHARMA *et al.*, 2019).

Nanopartículas (NPs) são definidas por materiais com tamanho entre 1 a 100 nm que podem ser tanto de fontes naturais como antropogênicas. As de fontes naturais são partículas ultrafinas no ar, os coloides aquáticos são compostos por ácidos húmicos e fúlvicos, proteínas e peptídeos, e coloides inorgânicos como óxidos de ferro hidratado e manganês; e nos solos, as argilas, matéria orgânica, óxidos de ferro e outros minerais. Em relação à quantidade destas NPs no meio ambiente, como a indústria tem utilizado amplamente as NPs industrializadas, a concentração destas é mais alta em relação às de fontes naturais (KLAINÉ *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014; MEARNNS *et al.*, 2015). Entre os diferentes tipos de nanomateriais (nanotubos de carbono, fulerenos, nanopartículas de ouro, prata, óxido de zinco, dióxido de silício, entre outras), as NPs de dióxido de titânio (nano-TiO<sub>2</sub>), por sua capacidade de branqueamento e de absorver radiação ultravioleta, são as mais utilizadas em inúmeros produtos de consumo humano, tais como pigmentos, protetores solares, cosméticos, cerâmicas, revestimentos de superfície, células solares, aditivos alimentares, produtos antimicrobianos e fotocatalíticos (MUELLER; NOWACK, 2008, WANG *et al.*, 2014, JOHNSON *et al.*, 2015, CANESI; CORSI, 2016). Estima-se que a produção global de nanomateriais em 2014 foi entre 0,3 e 1,6 milhões de toneladas, tendo as nano-TiO<sub>2</sub> uma produção entre 60 mil e 150 mil toneladas (PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016; SWARTZWELTER *et al.*, 2021). Por decorrência dessa ampla utilização, estas NPs podem atingir ambientes aquáticos, incluindo os ecossistemas marinhos. Elas podem atingir os mares a partir de diferentes fontes e rotas, como por meio de lixiviados de aterros sanitários ou descarte direto de resíduos, o que pode afetar sua natureza química e, conseqüentemente, seu destino, comportamento e toxicidade, tornando-se, assim, uma fonte de poluição de difícil remediação devido ao seu tamanho em escala nanométrica e, ainda, por adsorverem outras substâncias potencialmente tóxicas (KLAINÉ *et al.*, 2008; MEARNNS *et al.*, 2015, MOTTIER *et al.*, 2017; SWARTZWELTER *et al.*, 2021).

Um material particulado pode ser relativamente inerte numa forma maior, mas com a diminuição do seu tamanho para nanoescala pode modificar suas propriedades físico-químicas, conferindo-lhes comportamentos novos e únicos; que ao mesmo tempo são características valiosas para a indústria, porém podem tornar o material mais tóxico, pois a sua área de superfície é aumentada (com o aumento de partículas reativas na superfície), possibilitando uma maior interação e absorção por tecidos biológicos. Além do tamanho, outras propriedades como forma, agregação/aglomeração, revestimento de superfície e solubilidade também podem afetar

diretamente as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais, e, conseqüentemente, as suas interações com os sistemas biológicos (NEL *et al.*, 2006; XIONG *et al.*, 2013; SWARTZWELTER *et al.*, 2021).

Adicionalmente, fatores como a presença de materiais orgânicos naturais, a força iônica da água, e a própria concentração das NPs, podem alterar o comportamento destas em diferentes ambientes e, conseqüentemente, afetar a propriedade de agregação/aglomeração, influenciando, diretamente, na biorreatividade e biodisponibilidade das NPs (JOHNSON *et al.*, 2015). Por isso, ao se trabalhar com ecotoxicidade de NPs, é de extrema importância realizar a caracterização dessa NP e avaliar o seu comportamento no meio usado para exposição. A caracterização inicial inclui: a descrição da composição do material, o tamanho nominal, a forma e a carga superficial (potencial  $\zeta$ ); em seguida, avalia-se o comportamento da NP no meio usado nas exposições. Os parâmetros avaliados nesta etapa são: o estado de agregação (*Z average*), a mudança na carga superficial (potencial  $\zeta$ ) e o índice de dispersão (PDI). Este último é importante para entender o comportamento das NPs em ambiente aquoso (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018; SWARTZWELTER *et al.*, 2021).

A alteração desses parâmetros ao longo do tempo também pode ser útil para uma avaliação ainda mais completa da dinâmica das NPs no meio de exposição. Essas análises são geralmente realizadas por meio da análise de DLS (Dispersão de Luz Dinâmica) ou microscopia eletrônica (MET e MEV), dependendo do material que está sendo investigado (SWARTZWELTER *et al.*, 2021).

Apesar da ampliação dos conhecimentos na área, ainda pouco se sabe sobre os efeitos da exposição ambiental deste tipo de substância, e, principalmente, seus efeitos nos ecossistemas aquáticos e na fauna marinha (MUELLER; NOWACK, 2008; CANESI *et al.*, 2010a; WANG *et al.*, 2014). Considerando isso, se faz necessário aprofundar a investigação sobre os seus possíveis efeitos tóxicos. Nesse sentido, a ecotoxicologia busca integrar as propriedades químicas das NPs, as possíveis vias de exposição e as respostas nos organismos bioindicadores expostos, buscando assim, analisar os seus impactos nos ecossistemas marinhos (CORSI *et al.*, 2014).

### **1.3 Bioindicadores**

Bioindicadores são uma ferramenta importante para detectar mudanças positivas ou negativas no ambiente, e seus efeitos na sociedade humana. O seu uso ajuda a determinar os impactos biológicos de poluentes em um organismo, e é uma maneira de diagnosticar,

precocemente, os efeitos nocivos que determinada substância possa causar aos ecossistemas (PARMAR, 2016).

McCarty e Munkittrick (1996, p.271) definiram:

Um bioindicador é uma variação induzida antropogenicamente em componentes, processos, estruturas ou funções bioquímicas, fisiológicas ou ecológicas (isto é, um biomarcador) que tenha sido estatisticamente correlacionado ou causalmente ligado, de maneira, pelo menos semiquantitativa, a efeitos biológicos em um ou mais níveis do organismo, população, comunidade ou ecossistema da organização biológica.

Muitos efeitos prejudiciais de diversos tipos de NPs têm sido descritos em organismos marinhos. A literatura (BAUN *et al.*, 2008; FARRÉ *et al.*, 2009; CANESI; CORSI, 2016) relata efeitos em peixes (toxicidade respiratória, efeitos no desenvolvimento e estresse oxidativo), em copépodos (efeitos no desenvolvimento, no sistema imune e mortalidade), em equinodermos (efeitos no desenvolvimento e no sistema imune), e em bivalves (genotoxicidade, estresse oxidativo, efeitos no desenvolvimento e no sistema imune). É notável que os invertebrados são potenciais alvos biológicos da exposição de NPs (CORSI *et al.*, 2014).

#### **1.4 Bivalves como bioindicadores para os efeitos das NPs**

Os bivalves marinhos constituem um grupo alvo para a ecotoxicologia. Segundo alguns autores (WIDDOWS; DONKIN, 1992; MEADOR *et al.*, 1995; CAJARAVILLE *et al.*, 2000; GRIETA *et al.*, 2015), moluscos bivalves são excelentes bioindicadores de poluição marinha e estuarina por possuírem as seguintes características:

- São organismos filtradores, ou seja, se alimentam de partículas em suspensão e, por isso, bombeiam grandes volumes de água podendo acumular produtos químicos em seus tecidos;
- São organismos sésseis, ingerindo contaminantes químicos presentes e representativos de uma determinada área;
- São dominantes nas comunidades do litoral e do estuário, e com ampla distribuição geográfica;
- São de fácil coleta;
- São relativamente tolerantes (mas não indiferentes) a uma ampla gama de condições ambientais;
- A quantificação de produtos químicos em tecido bivalve fornece uma avaliação da biodisponibilidade, o que não fica evidente na simples medição direta nos diferentes compartimentos ambientais (água, partículas suspensas e sedimentos);



- As concentrações de contaminantes nos tecidos de bivalves refletem, com maior precisão, a magnitude dos contaminantes orgânicos, pois estes organismos têm menor capacidade de metabolizá-los, diferentemente do que ocorre em peixes e crustáceos e, por último;
- São comercialmente importantes em todo o mundo e a medição da contaminação química é de interesse para considerações de saúde pública.

Efeitos de diferentes tipos de contaminantes podem ser avaliados nestes animais, tanto em testes *in vitro*, como *in vivo*. Ensaio realizados com esses animais como: imunotoxicidade, genotoxicidade, estresse oxidativo e lisossômico, junto com a caracterização das NPs, ajudam a entender os mecanismos e a ação tóxica desses materiais nesses organismos (CANESI *et al.*, 2012). A importância deste tipo de investigação faz-se ainda mais crítica quando se trata de bivalves de consumo humano, pois ajuda também na compreensão da potencial transferência de nanopartículas via cadeia trófica (CANESI *et al.*, 2012).

Para melhor compreensão dos efeitos das alterações ambientais nas espécies deste grupo de moluscos, uma das propostas é estudar a sua imunologia, pois estudos anteriores demonstram que seus mecanismos de defesa são suscetíveis a fatores de estresse ambiental (DYRYNDA *et al.*, 2000; MAYRAND; ST-JEAN; COURTENAY, 2005; AKAISHI *et al.*, 2007; MELLO; PROENÇA; BARRACCO, 2010), e em relação às NPs, há evidências de que o sistema imune representa um alvo significativo (CORSI *et al.*, 2014).

Os organismos bentônicos e sedimentares são alvos mais fáceis de exposição às NPs. Uma vez na água, as NPs podem interagir com matéria orgânica ou com outras NPs, podendo se agregar e se depositar no fundo do mar (COULEAU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014; MARISA *et al.*, 2018; SWARTZWELTER *et al.*, 2021). Em relação aos bivalves, o seu hábito de alimentação por filtração e o seu sistema circulatório aberto, que possibilita o contato direto com o ambiente externo, contribuem para o aumento da interação aos contaminantes ambientais (SWARTZWELTER *et al.*, 2021).

Sabe-se que a glândula digestiva dos animais filtradores é o alvo primário da toxicidade de NPs (CANESI *et al.*, 2010b), e que estas podem ser transferidas do sistema digestório para a hemolinfa, afetando os hemócitos circulantes (CANESI *et al.*, 2012). Segundo Marisa e colaboradores (2015), as nano-TiO<sub>2</sub>, especificamente, alteram características funcionais destas células, podendo induzir, por exemplo, a diminuição de respostas imunes celulares em processos como a fagocitose, sendo este um importante instrumento de monitoramento de

estresse ambiental e capaz de fornecer informações sólidas sobre os efeitos deste tipo de contaminante em moluscos bivalves. Ademais, um sistema imune deficiente favorece a invasão de organismos potencialmente patogênicos e oportunistas (KHAN; THULIN, 1991), o que é desinteressante do ponto de vista econômico e de saúde pública, quando se trata de animais explorados pela indústria alimentícia.

### 1.4.1 Sistema Imune de Bivalves

O sistema circulatório dos bivalves é aberto, e a circulação é garantida por um coração sistêmico, que está localizado próximo ao músculo adutor. Os hemócitos são as células sanguíneas que circulam na hemolinfa, e desempenham papel central no sistema imune, além de contribuir para outras funções biológicas, como cicatrização, digestão de alimentos, transporte de nutrientes, reprodução, excreção, formação da concha e produção e secreção dos líquidos humorais (ALLAM; RAFTOS, 2015).

A sua defesa interna é baseada em um sistema inato, não linfóide, que envolve componentes celulares e humorais. Dos componentes celulares, a fagocitose ou encapsulamento, com subsequente eliminação do patógeno, via atividade enzimática, é considerada o principal mecanismo de defesa interna em invertebrados. Os hemócitos de todas as espécies de bivalves estudados, até o momento, possuem capacidade fagocítica. Estas células podem englobar uma variedade de partículas, incluindo bactérias, algas, leveduras, células sanguíneas estranhas e esferas de látex (WOOTTON; DYRYNDA; RATCLIFFE, 2003).

Já foram realizados estudos sobre os impactos da poluição ambiental no sistema imune inespecífico de *Mytilus edulis* (LIVINGSTONE; PIPE, 1992; MAYRAND, ST-JEAN; COURTENAY, 2005; CORAY, ST-JEAN; BARD, 2007) e *Mytilus galloprovincialis* (CANESI *et al.*, 2015). Segundo Mayrand, St-Jean e Courtenay (2005), Coray, St-Jean e Bard (2007) e Mello, Proença e Barracco (2010), ambientes poluídos afetam diretamente a quantidade de hemócitos, o perfil de suas subpopulações, e conseqüentemente, sua capacidade fagocítica, diminuindo a habilidade de eliminação de agentes patogênicos e ocasionando mudanças em relação à depuração das espécies reativas de oxigênio. Apesar do impacto de ambientes poluídos sobre as células destes animais, Mayrand, St-Jean e Courtenay (2005) demonstraram que é possível a recuperação do sistema imune, como melhora da capacidade fagocítica, por exemplo, ao se transferir os animais de um local poluído para outro menos impactado. Evidenciando assim, que os efeitos deletérios causados por poluentes podem não ser permanentes e que são passíveis de serem remediados.

### 1.5 *Amarillodesma mactroides*

Dentre os bivalves marinhos da costa brasileira, a família Mesodesmatidae é representada por moluscos de areia com importância socioeconômica (SANTOS, 2014), e são exploradas por pesca comercial e de lazer em praias do Brasil, Uruguai e Argentina (FIORI; DEFEO, 2006). Uma das espécies desta família é o marisco branco (*A. mactroides*), que possui o sinônimo científico *Mesodesma mactroides* (Reeve, 1854). Estes organismos habitam praias com características dissipativas (FIORI; DEFEO, 2006), ou seja, praias onde a energia das ondas é dissipada ao longo da extensa zona de surfe e que geralmente possuem sedimentos finos, distribuídos homogeneamente ao longo da praia (AMARAL; NALLIN, 2011). A sua distribuição geográfica vai desde a baía de Santos até o Rio Negro na Argentina, mas com maior abundância entre a praia do Cassino, na cidade de Rio Grande, no Rio Grande do Sul e Barra do Chuí, no Uruguai (FIORI; DEFEO, 2006).

Esta espécie, em condições normais, se alimenta de material em suspensão, porém experimentos laboratoriais demonstraram que em condições extremas pode alimentar-se também de detritos contidos no sedimento (DEFEO; SCARABINO, 1990).

Apesar da grande diversidade de animais da classe Bivalvia, apenas um número limitado de espécies, como as do gênero *Mytilus* sp., e a ostra americana, *Crassostrea virginica*, foi intensamente estudada em relação à imunologia e aos impactos da poluição ambiental. Portanto, considera-se de extrema importância a inclusão de novas espécies para a expansão do conhecimento existente sobre imunidade bivalve e alteração de sua imunocompetência devido a exposição a xenobióticos, e consequente aumento da suscetibilidade a doenças (WOOTTON; DYRYNDA; RATCLIFFE, 2003; BARTH; MORAES; BARRACCO, 2005). E, segundo Santos (2014), estudos específicos, avaliando o sistema imune de *A. mactroides*, ainda são raros. Por isso, considerou-se interessante o estudo em busca da compreensão dos impactos de NPs sobre a imunidade inespecífica nesta espécie de bivalve contribuindo para o conhecimento existente sobre imunidade bivalve e imunotoxicologia das NPs para uma espécie diferente das comumente utilizadas em estudos similares.

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito agudo da exposição a nanopartículas de dióxido de titânio na imunidade celular inespecífica do Marisco Branco (*Amarillodesma mactroides*).

## 2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterização da imunidade celular:

- Caracterização dos hemócitos do marisco branco (*Amarillodesma mactroides*)
- Contagem diferencial e total dos hemócitos;
- Mensuração da capacidade fagocítica

Caracterização das nano-TiO<sub>2</sub>:

- Caracterização do tamanho e comportamento as nano-TiO<sub>2</sub> em água do mar

Avaliação do efeito da exposição aguda *in vivo* às nano-TiO<sub>2</sub>:

- Na viabilidade dos hemócitos pós exposição às nano-TiO<sub>2</sub>
- Na capacidade germicida;

Avaliação do efeito da exposição aguda *in vitro* das nano-TiO<sub>2</sub>:

- Na capacidade fagocítica dos hemócitos

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Coleta dos Animais

As coletas foram realizadas em praias do município de Ilha Comprida (latitude 24°45'31.9" sul e longitude 47°33'51.1" oeste), sul do estado de São Paulo (Fig. 1), nos períodos de 22 a 24 de julho de 2018, e 3 de fevereiro de 2020. Foram coletados animais com comprimento superior a 43 mm, por já serem considerados adultos (BERGONCI, 2005). A coleta teve a autorização concedida pelo ICMBio (n° 62408-1).

Os parâmetros ambientais e climáticos foram registrados no momento da coleta, para possibilitar futuras correlações com os achados neste estudo.

Figura 1 - Mapa de localização da Ilha Comprida, São Paulo, Brasil



Fonte: (COSTA; JANKOWSKY; MOURA, 2016)

### 3.2 Manutenção dos Animais em Laboratório

Após as coletas, todos os animais foram transportados vivos, em caixas térmicas, enterrados no sedimento retirado na mesma praia da coleta, até o biotério de animais aquáticos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do ICB-USP. No biotério, os animais foram mantidos em aquários em temperatura ambiente, contendo sedimento não processado (retirado da praia de Ilha Comprida) e 10 litros de água do mar natural (NSW; água do mar natural, do inglês “*natural seawater*”) trazida da base do CEBIMar em São Sebastião, com os parâmetros de salinidade de 35‰ e pH 8 tendo 50% de renovação a cada dois dias. Os animais foram alimentados diariamente com microalgas das espécies *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* cedidas pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) do IO-USP, numa concentração de  $1 \times 10^5$  céls / mL de cada espécie (informação pessoal)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> SANTOS, J.J.S – Mensagem recebida em amanda.rosa@gmail.com em 17 de maio de 2018.

### 3.3 Caracterização da imunidade Celular de *Amarillodesma mactroides*

#### 3.3.1 Caracterização/Identificação dos Hemócitos

Para a caracterização e identificação dos hemócitos, a hemolinfa de 3 animais foi obtida com o auxílio de uma seringa de 1 mL, previamente carregada com a solução anticoagulante de tampão citrato / EDTA (0,45 M NaCl; 0,1 M glucose; 30 mM citrato de sódio; 26 mM ácido cítrico e 10 mM EDTA; pH 4,6, armazenado a 4°C) (MATOZZO, 2010) na proporção de 1:1 pela cavidade pericardial (SANTOS, 2014), especificamente do músculo adutor posterior (MAYRAND, ST-JEAN; COURTENAY, 2005; CORAY, ST-JEAN; BARD, 2007; FRASER *et al.*, 2013; CANESI *et al.*, 2015). A hemolinfa de cada animal foi centrifugada a 600 x g (4°C, 10 min.) para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de paraformaldeído 4%, em água do mar filtrada (FSW, do inglês *filtered seawater*, 0,22 µm). A hemolinfa foi então disposta em lâminas e mantidas por 24h para secagem em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para identificação e contagem diferencial dos tipos celulares.

Os hemócitos foram caracterizados quanto à sua morfologia por microscopia de luz, baseando-se no tamanho das células e na presença/ausência de grânulos. Foram utilizados como base para a identificação dos diferentes tipos celulares a literatura disponível para bivalves (WOOTTON; DYRYNDA; RATCLIFFE, 2003; ALLAM; RAFTOS, 2015) e o trabalho de Santos (2014) específico para a espécie *A. mactroides*. A mensuração das células foi realizada pelo software ImageJ<sup>®</sup> com imagens obtidas com a câmera AxioCam HRc S/N 2 23 11 1303.

#### 3.3.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)

Para a contagem diferencial foram utilizadas as mesmas lâminas preparadas para a identificação e caracterização dos hemócitos, cuja metodologia encontra-se descrita acima. A contagem foi realizada utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Contagem Diferencial} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cada tipo celular} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de células}}$$

### 3.3.3 Teste de Viabilidade Fúngica

Para os ensaios de fagocitose, foram utilizadas leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* vivas (Itaiquara<sup>®</sup>) com viabilidade superior a 90%. As leveduras foram escolhidas por serem microorganismos não-patogênicos eficientes na indução das respostas imunes inespecíficas de invertebrados, conforme descrito para ouriços e estrelas do mar (SILVA, 2000; SILVA *et al.*, 2001, BORGES *et al.*, 2002). Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer de leveduras vivas em relação ao total, para fazer o cálculo de viabilidade celular e do volume da suspensão de leveduras a ser utilizada nos ensaios de fagocitose para ter a proporção de leveduras por hemócito de 10:1.

Foi preparada uma solução em 5 mL de FSW, com 8 µL de diacetato de fluoresceína (FDA) (5 mg/mL) (Sigma<sup>®</sup>) em acetona (SILVA *et al.*, 2000) e 50 µL de iodeto de propídeo (PI) (2 mg/mL) (Sigma<sup>®</sup>) em FSW (DELAPORTE *et al.*, 2003). Esta solução (FDA-PI) foi utilizada para identificar as leveduras vivas e mortas antes dos ensaios de fagocitose. O teste de viabilidade das leveduras foi realizado à temperatura ambiente (25°C).

As células vivas emitem fluorescência verde devido à penetração do diacetato de fluoresceína, e as células mortas emitem fluorescência vermelha devido à penetração do iodeto de propídeo e intercalação deste nas moléculas de DNA. A fluorescência emitida pelos fluorocromos foi então observada sob microscopia de fluorescência (Zeiss AXIOScope. A1 – com sistema de fluorescência a LED) com filtro verde, para observar as células que estão vivas, e o filtro vermelho para visualizar as células mortas.

### 3.3.4 Ensaio de Fagocitose

Com a utilização de seringas de 1 mL, a hemolinfa de 3 indivíduos foi coletada com anticoagulante ACD-B, livre de EDTA (4,8 g/L de ácido cítrico, 13,2 g/L de citrato de sódio, 14,7 g/L de glicose e 1,2 g/L de cloreto de sódio) (ZHOU, 2018), na proporção (1:1).

A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  hemócitos/mL. Foram preparadas lâminas com o *pool* de hemolinfas e deixadas em câmara úmida sob temperatura ambiente, por 1, hora para adesão e espriamento das células. Posteriormente, as células foram homogeneizadas com uma suspensão de leveduras *S. cerevisiae* com viabilidade acima de 90%. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por mais 1 h em câmara úmida em temperatura ambiente.

Após uma primeira observação das lâminas, estas foram fixadas com solução de paraformaldeído (4% em FSW) e coradas com o corante Rosenfeld filtrado (ROSENFELD, 1947). Este procedimento auxilia a visualização da fagocitose, tornando mais fácil as observações e permite que o material possa ser armazenado para análises futuras. O índice de fagocitose foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade Fagocítica: CF} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de hemócitos fagocitando}}{\text{n}^\circ \text{ total de hemócitos}}$$

### 3.4 Avaliação do efeito agudo da nano-TiO<sub>2</sub> na imunidade de *A. mactroides*

#### 3.4.1 Caracterização da nano-TiO<sub>2</sub>

As nano-TiO<sub>2</sub> (Aeroxide<sup>®</sup>, 99,9% - Eigenmann & Veronelli), foram fornecidas pela Profa. Dra. Ilaria Corsi (Universidade de Siena, Itália). O lote utilizado nos experimentos, tiveram diâmetro médio de  $24 \pm 7$  nm (DELLA TORRE *et al.*, 2015).

As NPs utilizadas no presente estudo foram as mesmas usadas no estudo realizado por Pinto (2021); estudo, este, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa. Portanto, a caracterização das NPs, apresentada no presente trabalho, é a mesma para ambos os estudos.

Para a caracterização, primeiramente, foi preparada uma solução estoque de nano-TiO<sub>2</sub> (10 mg/mL) em água Milli-Q<sup>®</sup>, sendo submetida à sonicação (100 W por 45 min em banho de gelo) (DELLA TORRE *et al.*, 2015). Após este processo, foram preparadas as soluções finais em água do mar filtrada a  $0,22 \mu\text{m}$  (FSW,  $25^\circ\text{C} \pm 2$ , salinidade: 35, pH:  $7.8 \pm 0.2$ ). Esta água foi coletada no mesmo local da água utilizada nos experimentos deste trabalho.

Com a técnica de DSL (Dispersão de Luz Dinâmica) determinou-se o tamanho das nano-TiO<sub>2</sub>, o tamanho médio hidrodinâmico das nanopartículas (*Z-average*, nm) e o índice de polidispersão (PDI, adimensional).

A carga superficial das nanopartículas (potencial  $\zeta$ , mV) foi determinada pela mobilidade eletroforética (ME) usando um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments).

Para as análises do presente trabalho, foram preparadas soluções da nano-TiO<sub>2</sub> a 5 mg/mL em água Milli-Q<sup>®</sup> e em FSW (do mesmo local de coleta da água utilizada nos experimentos). A água Milli-Q<sup>®</sup> foi utilizada como controle do meio, pois é uma água ultrapura



e não possui outras substâncias com as quais as nanopartículas possam interagir, diferentemente da NSW, que contém matéria orgânica e íons.

Após o preparo, as nano-TiO<sub>2</sub> foram submetidas rapidamente à homogeneização em um agitador do tipo Vórtex. Em seguida, foram feitas 3 medições para cada condição, a 25°C. Para a análise DLS foram realizadas 11 corridas de 10 s cada, e para a ME foram feitas 20 corridas.

Para acompanhar as mudanças dinâmicas da nano-TiO<sub>2</sub> em relação ao tempo, foram realizadas análises DLS (a 25°C, no escuro) em intervalos de 7 minutos, de 0 até 63 minutos após a dispersão em FSW.

### **3.4.2 Exposição *in vivo***

#### **3.4.2.1 Análise da Água do Mar**

Com o intuito de verificar uma possível contaminação da água do mar coletada no Cebimar-USP (São Sebastião, SP), e utilizada nos ensaios, com dióxido de titânio ambiental, amostras da água foram enviadas para análise no Instituto de Pesquisas Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN-USP).

Para a amostragem, a água foi coletada em 6 tubos do tipo falcon (50 mL) de galões mantidos no biotério de animais aquáticos do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do ICB-USP. Foram misturadas porções de água dos diversos galões em cada tubo amostral.

As águas coletadas foram posteriormente separadas em tubos do tipo falcon de 15 mL. Em três destes tubos, foi adicionado 300 µL de ácido nítrico a 65% (BRANDÃO, 2011) e completados com a água do mar. Em outros três tubos de igual volume, foram mantidos os mesmos volumes de água do mar sem a adição do ácido. Todas as amostras foram guardadas em refrigerador até serem transportadas ao IPEN-USP para análise.

A detecção de titânio (Ti) na água do mar feita por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio (ÍCP-OES; Espectrômetro Spectro) no Laboratório de Análises Química e Ambiental – LAQA-IPEN. Foi utilizado como controle positivo uma solução de Ti (Inorganic Ventures, lote K2-Ti02118).

A análise teve por objetivo detectar a presença de titânio total na água, podendo, este, ser de fontes naturais ou antrópicas, livre ou na forma de dióxido de titânio.

### 3.4.2.2 Preparação da nano-TiO<sub>2</sub>

A solução estoque (10 mg/mL) foi preparada em água ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>), e de acordo com os estudos de Canesi e colaboradores (2010b) e Barmo e colaboradores (2013). A solução foi submetida à sonicação, em banho de gelo, por 30 min a 100 W, 50% ciclo liga / desliga, a fim de serem obtidas suspensões uniformes de NP. As concentrações finais (0,01; 0,1 e 1,0 mg/L), foram preparadas em FSW (0,45 µm) antes da exposição.

### 3.4.2.3 Testes de Toxicidade

Os grupos experimentais foram compostos por dois grupos controles e três grupos testes. No primeiro grupo controle, os animais foram mantidos com sedimento e no segundo grupo controle, sem o sedimento, visando, desta forma, avaliar uma possível influência da ausência/presença do sedimento na imunidade, uma vez que este animal é infaunal, e a condição dos grupos testes foi de exposição às NPs sem o sedimento. Os três grupos testes foram expostos às nano-TiO<sub>2</sub> conforme a seguinte configuração: Grupo 1: 1 mg/L / animal; Grupo 2: 0,1 mg/L / animal; e Grupo 3: 0,01 mg/L / animal. Foram utilizados 5 aquários, cada um contendo 10 animais, e 10 litros de água do mar (Fig. 2). Cinco animais foram utilizados para os testes de exposição de 24 h e os outros cinco para o tempo de exposição de 96h. (Tabela 1).

As concentrações supracitadas foram escolhidas por serem próximas às concentrações ambientais encontradas no ambiente aquático, que, segundo Mueller e Nowack, (2008) e Minetto, Libralato e Volpi Ghirardini (2014), estão por volta de 0,7 µg/L (0,0007 mg/L) num cenário realístico e 16 µg/L (0,016 mg/L) num cenário de grande emissão, mas que conforme demonstrado em estudos anteriores, já tem potencial de causar efeitos no sistema imune de outras espécies de bivalves (CANESI *et al.*, 2010b, COULEAU *et al.*, 2012, BARMO *et al.*, 2013).

Tabela 1- Grupos Experimentais

Tempo de Exposição	
24h	96h
Controle COM sedimento	Controle COM sedimento
Controle SEM sedimento	Controle SEM sedimento
Nano-TiO <sub>2</sub> 0,01 mg/L	Nano-TiO <sub>2</sub> 0,01 mg/L
Nano-TiO <sub>2</sub> 0,1 mg/L	Nano-TiO <sub>2</sub> 0,1 mg/L
Nano-TiO <sub>2</sub> 1,0 mg/L	Nano-TiO <sub>2</sub> 1,0 mg/L

Os animais foram pesados e identificados com números, feitos a lápis em suas conchas, e foram, então, distribuídos nos diferentes aquários, de modo que a distribuição entre os grupos ficasse homogênea. Os parâmetros da água de cada um dos aquários foram monitorados imediatamente antes da exposição às diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>, que foi realizada às 16 h do dia 02 de setembro de 2018.

Após 24 h de exposição, foram medidos os parâmetros da água de cada aquário, e retirados 5 dos animais de cada grupo para a realização dos ensaios. Após 96 h, o mesmo procedimento foi realizado, com a retirada dos outros 5 animais restantes de cada grupo.

Figura 2- Aquários dos grupos controles e de exposição imediatamente antes do primeiro experimento em 24 h após exposição às nano-TiO<sub>2</sub>.



#### 3.4.2.4 Análise de sobrevivência

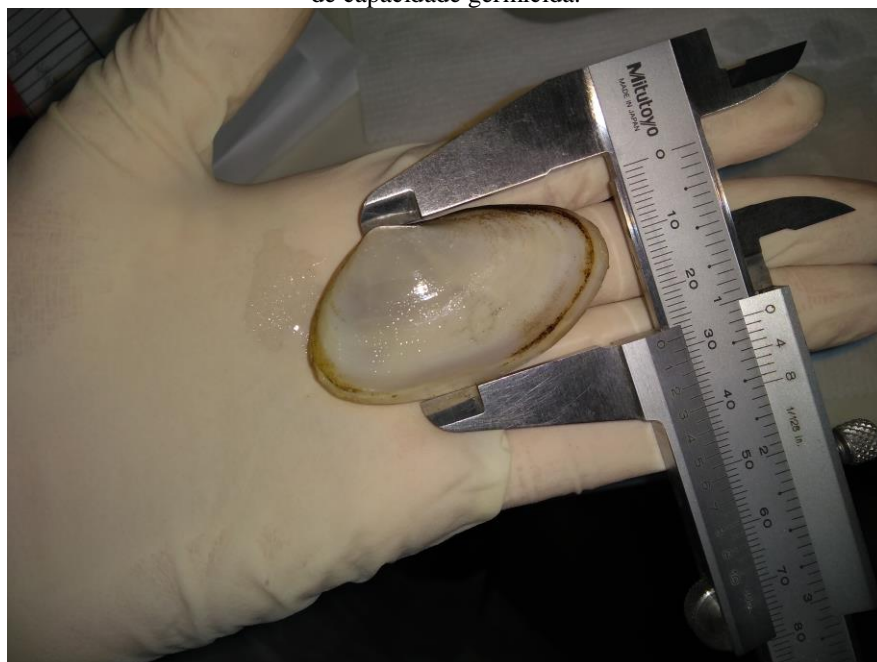
Os animais foram monitorados diariamente para observação e controle de eventuais mortalidades. Considera-se morto o animal que apresenta as valvas permanentemente abertas, os sifões estendidos e ausência de resposta no pé (CARVALHO; ROMANO; POERSCH, 2015).

#### 3.4.2.5 Teste de Viabilidade Celular e Contagem Total de Hemócitos (CTH)

Após 24 e 96 h de exposição, foram retirados dos aquários 5 animais de cada grupo para a realização dos testes de toxicidade. Primeiramente foi realizada a medição (Fig.3) e pesagem de cada indivíduo já identificados com números a lápis em suas conchas.

Com a utilização de seringas de 1 mL, a hemolinfa de cada indivíduo dos grupos foi coletada com anticoagulante ACD-B, na proporção (1:1). A solução de FDA-PI foi adicionada à hemolinfa para se prosseguir com a contagem dos hemócitos vivos e mortos e o total em câmara de Neubauer (BORGES *et al.*, 2002).

Figura 3 - Medição dos exemplares de *A. mactroides* antes da coleta da hemolinfa para a realização dos ensaios de capacidade germicida.



### 3.4.2.6 Ensaio para avaliação da capacidade germicida

Para avaliação da capacidade germicida, foi realizado o procedimento padronizado de fagocitose já descrito anteriormente. Porém, transcorrido o tempo de incubação da fagocitose, foi realizada a técnica de incorporação de FDA-PI para a identificação e contagem de leveduras fagocitadas e mortas. Posteriormente foram calculados os índices de capacidade germicida através da seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade Germicida: CG} = \frac{\text{número de leveduras mortas}}{25 \text{ leveduras fagocitadas}}$$

Para o cálculo da capacidade germicida, é utilizada uma associação de duas técnicas: contraste interferencial de fase (permite a comprovação da internalização das leveduras) e fluorescência (permite identificar se as leveduras internalizadas estão vivas ou mortas) (SILVA *et al.*, 2001).

### 3.4.3 Exposição *in vitro*

Para estes experimentos foram utilizados os animais da coleta de fevereiro de 2020. Os animais foram aclimatados no biotério por 7 dias antes dos experimentos serem iniciados, com os mesmos cuidados da coleta anterior, com renovação da NSW a cada dois dias, e sendo alimentados diariamente com microalgas das espécies *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans*.

#### 3.4.3.1 Concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>

As concentrações de nano-TiO<sub>2</sub> escolhidas para as exposições *in vitro* foram de 0,001, 0,01, 0,1, 1 e 5 µg/mL. Estas concentrações foram escolhidas visando contemplar a maior gama possível de concentrações a serem testadas, desde a mais baixa, próxima à concentração ambiental segundo Mueller e Nowack (2008) e Minetto, Libralato e Volpi Ghirardini (2014), contemplando, também, as concentrações utilizadas nas exposições *in vivo*, e 5µg/mL, para verificar o comportamento da resposta imune dos hemócitos frente a uma concentração mais elevada.

Para se alcançar as referidas concentrações, foi necessário preparar soluções intermediárias. Para isso, primeiramente se preparou uma solução estoque na concentração de 1mg/mL de nano-TiO<sub>2</sub>. A partir da solução estoque, foi preparada uma solução intermediária 1, na concentração de 100 µg/mL. A partir da solução intermediária 1, foi preparada uma solução intermediária 2, na concentração de 10 µg/mL. A partir da solução intermediária 2, foi preparada uma solução intermediária 3, na concentração de 1 µg/mL. E a partir da solução intermediária 3 foi preparada uma solução intermediária 4, na concentração de 0,1 µg/mL.

### 3.4.3.2 Ensaio de fagocitose

Para cada experimento realizado, foi utilizado o pool de hemolinfa de 5 animais. Esta hemolinfa foi coletada juntamente com anticoagulante ACD-B e depositada em tubos de 50 mL, que foi levado à centrifuga a 800G, a 4°C por 10 minutos para formação de precipitado celular e subsequente descarte do sobrenadante. Os hemócitos foram ressuspensos em 1mL de FSW para contagem em câmara de Neubauer. Após contagem, o volume presente no tubo de coleta foi ajustado com FSW para alcançar a concentração de  $5 \times 10^4$  células / mL.

A solução com hemócitos foi transferida para placa de 24 poços, contendo volume final de 1 mL. A placa foi incubada em ambiente escuro por 30 min a 25°C para adesão celular. Após este período, o meio foi trocado por FSW contendo as diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>. As placas foram então incubadas novamente em ambiente escuro, por 1h a 25°C.

Após o período de exposição, foi realizado o procedimento padronizado de fagocitose já descrito anteriormente. Sendo, no final, os hemócitos fixados em paraformaldeído 4% e corados com a técnica de Rosenfeld, para visualização das leveduras fagocitadas. Foram contabilizados 100 hemócitos diferenciados quanto a presença/ausência de leveduras internalizadas em seu citoplasma segundo a fórmula de capacidade fagocítica.

## 3.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 8. Primeiramente, foram analisados em relação à normalidade, e os que são paramétricos, utilizou-se a ANOVA de uma via (*one-way-ANOVA*), com pós teste de Tukey (*in vitro*) e Dunnett (*in vivo*). Para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para

múltiplas comparações. Para os dados que exprimem porcentagem, foi aplicada a fórmula do Arcoseno antes de aplicar os demais testes.

As diferenças observadas entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

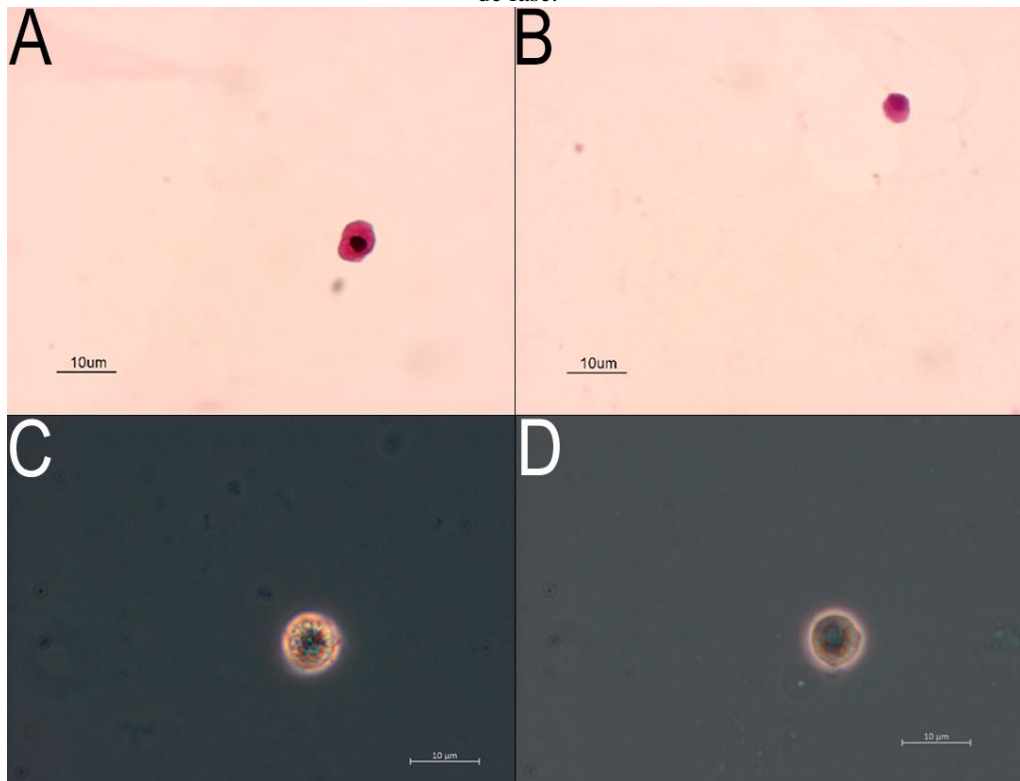
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Caracterização da imunidade Celular de *Amarilodesma mactroides***

#### **4.1.1 Caracterização/Identificação dos Hemócitos**

Com a utilização de técnicas de colocação com hematoxilina e eosina (Fig. 4A e 4B), e microscopia de fase (Fig 4C e 4D) foi possível observar as subpopulações celulares. A coloração dos hemócitos com hematoxilina e eosina evidenciou dois grupos celulares. Os granulócitos, com tamanho médio de  $5,39\mu\text{m} \pm 0,68$ , assim denominados pela presença de pequenos grânulos intracitoplasmáticos, ficaram evidenciados por apresentarem coloração mais rosada (são eosinofílicos, o que evidencia o seu caráter mais básico), e de forma mais irregular, enquanto que os hialinócitos, que não possuem grânulos, com tamanho médio de  $4,56\mu\text{m} \pm 0,56$ , apresentaram o citoplasma corado de lilás (mais ácido em relação aos granulócitos), com contorno mais regular (Figura 4A e 4B).

Figura 4 - Hemócitos do *A. mactroides*: A: Granulócito corado com HE sob microscopia de luz. B: Hialinócito corado com HE sob microscopia de luz. C: Granulócito sob microscopia de fase. D: Hialinócito sob microscopia de fase.



#### 4.1.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)

O resultado da contagem diferencial dos hemócitos (granulócitos e hialinócitos). Os dados da contagem encontram-se na Tabela 2. Onde foi possível observar que dentre as duas populações de células apresentadas para esta espécie, os granulócitos possuem uma concentração aproximadamente 20% maior do que a população de hialinócito.

Tabela 2- Contagem diferencial de hemócitos de *A. mactroides*.

Hemócitos	Porcentagem		
Granulócito	60,67%	±	3,61
Hialinócito	39,33%	±	3,61

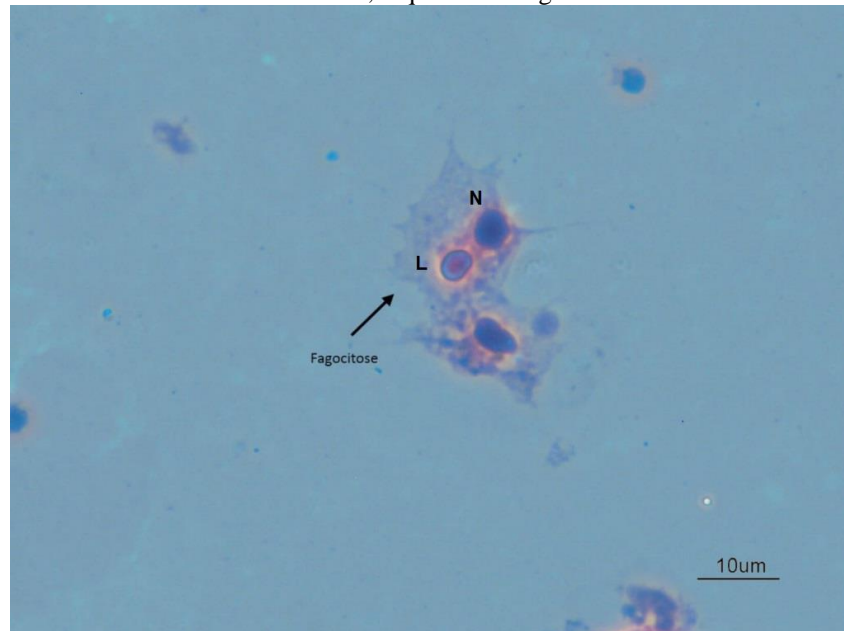
#### 4.1.3 Avaliação da Capacidade Fagocítica

Foi determinado e padronizado o método para avaliação da capacidade fagocítica nos hemócitos.



Após uma hora de incubação das leveduras com os hemócitos do marisco branco, foi possível observar uma média de 41% ( $\pm 0,03$ ) das células realizando fagocitose de, no mínimo, uma levedura, o que foi facilmente observado sob microscopia de contraste de fase com contracoloração de Rosenfeld (Fig. 5).

Figura 5 - Células de *A. mactroides* coradas com Rosenfeld sob microscopia de contraste de fase onde é possível visualizar o processo de fagocitose. Células espalhadas com N indicando o núcleo do hemócito e L a levedura internalizada, o que indica fagocitose.

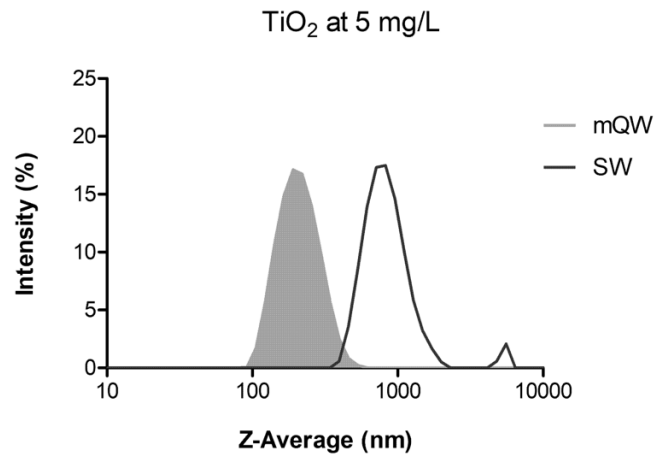


## 4.2 Avaliação do efeito agudo das nano-TiO<sub>2</sub> na imunidade de *A. mactroides*

### 4.2.1 Caracterização das nano-TiO<sub>2</sub>

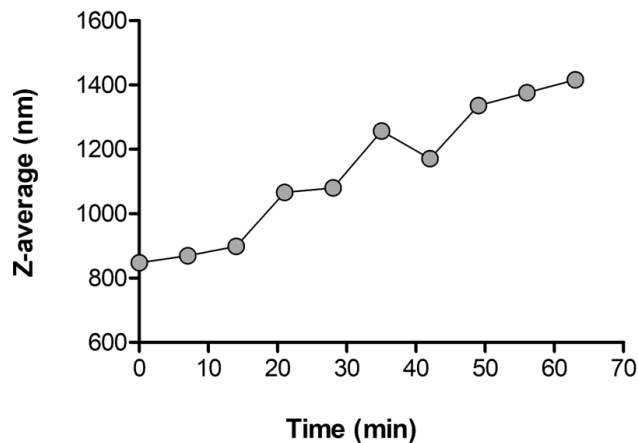
Ao comparar-se o comportamento da nano-TiO<sub>2</sub> nos dois diferentes meios (em água do mar e água Milli-Q<sup>®</sup>), pode-se observar que há maior agregação quando em água do mar, como observado na tabela 3 e figura 6. A agregação de partículas na água do mar atinge uma média de  $944,60 \pm 106,20$  nm comparada à  $204,30 \pm 4,59$  nm da água Milli-Q<sup>®</sup>. Na água do mar, há ainda um pequeno pico de nano-TiO<sub>2</sub> aglomerada, só que alcançando um tamanho maior, próximo de 10.000 nm.

Figura 6- Comparação do comportamento de aglomeração da nano-TiO<sub>2</sub> (5 µg/mL) em FSW e água Milli-Q®. Dados obtidos por análise DLS, com eixo-X mínimo em 10 nm (escala logarítmica). Média e desvio padrão de 3 medições.



Verificou-se também que, em água do mar, o diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO<sub>2</sub> aumenta proporcionalmente com o tempo (Fig. 7), chegando a um estado de agregação com tamanho de 1.400 nm após 1 h da incubação.

Figura 7- Comportamento de agregação da nano-TiO<sub>2</sub> (5 µg/mL) em FSW em relação ao tempo. Análise DLS em intervalos de 7 min até 63 min da preparação da suspensão. Média e desvio padrão de 3 medições.



A tabela 3 mostra, além do estado de agregação (*Z-average*), o índice de dispersão (PDI) e a carga superficial (potencial  $\zeta$ ). O PDI das nano-TiO<sub>2</sub> em FSW foi um valor maior de 0,330, enquanto em água Milli-Q® foi de  $0,210 \pm 0,015$ . A carga superficial das nano-TiO<sub>2</sub> em água Milli-Q® se mostrou mais negativa ( $-52,50 \pm 6,95$ ) do que as nano-TiO<sub>2</sub> em água do mar ( $-8,34 \pm 0,96$ ).

Tabela 3- Dados da análise DLS, mostrando as diferenças de tamanho em nm (*Z-average*), o índice de polidispersidade (PDI) e potencial  $\zeta$  (mV) das nano-TiO<sub>2</sub> (5  $\mu\text{g/mL}$ ) em FSW e água Milli-Q®. Os dados são a média e os desvios-padrão referentes a 3 medidas.

Meios de dispersão	Z-Average (nm)	PDI	Potential $\zeta$ (mV)
Milli-Q®	204,30 $\pm$ 4,59	0,210 $\pm$ 0,015	-52,50 $\pm$ 6,95
FSW	944,60 $\pm$ 106,20	> 0,330	-8,34 $\pm$ 0,96

## 4.2.2 Exposição *in vivo*

### 4.2.2.1 Análise de titânio na água do mar

As amostras identificadas pelas siglas 1F, 2F e 3F, foram as amostras de água do mar que foram filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  e as identificadas pelas siglas 1S, 2S e 3S foram as amostras não filtradas. Como se pode notar pela tabela 4, todas as amostras apontaram concentração de titânio abaixo de 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , que é o limite de detecção do aparelho.

Tabela 4- Análise da quantidade de titânio total das amostras de água do mar utilizadas nos experimentos. RG refere-se ao identificador da amostra, amostras de 1 a 3, seguidas de F, são as amostras de água do mar filtradas e as de 1 a 3, seguidas da letra S, são as amostras de água do mar não filtradas.

RG	Identificação da amostra	Concentração de Ti ( $\mu\text{g/mL}$ )
664/19	1F	<0,01
665/19	2F	<0,01
666/19	3F	<0,01
667/19	1S	<0,01
668/19	2S	<0,01
669/19	3S	<0,01

### 4.2.2.2 Testes de toxicidade

#### 4.4.2.2.1 Parâmetros da água utilizada nas exposições *in vivo*

Após 24 h de exposição, a temperatura da água nos aquários foi de 21,7° C, salinidade 35, pH próximo de 8 e amônia de 1,00 ppm, sem variação entre os diferentes grupos.

Após 96 h a temperatura da água variou de 17° C no aquário do grupo com concentração de 0,1 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> a 17,3° C nos grupos controle sem sedimento e com 0,01mg/L de nano-TiO<sub>2</sub>, a salinidade foi de 35 em todos os grupos, o pH também foi próximo de 8 e a amônia variou de 1,00 ppm, nos dois grupos controle a 3,00 ppm no grupo com 1 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub>.

#### 4.2.2.2.2 Análise de sobrevivência

Após o final de 24 e 96 horas de exposição dos animais às diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>, não foi registrada nenhuma morte.

#### 4.2.2.2.3 Viabilidade celular

Na comparação dos dois grupos controles, após 24 h de exposição a média da porcentagem de hemócitos vivos foi de 91,65% ± 3,30 no grupo com sedimento e 90,07% ± 4,07 no grupo sem sedimento (Fig. 08). Após 96 h de exposição, a porcentagem de células vivas foi de 86,42% ± 9,01 no grupo com sedimento e 87,74% ± 4,35 no grupo sem sedimento (Fig. 09). Em nenhum dos dois tempos, houve diferença significativa em relação à porcentagem de células vivas.

Figura 8 - Porcentagem de hemócitos vivos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 24 h de exposição. As barras correspondem a média ± desvio padrão, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

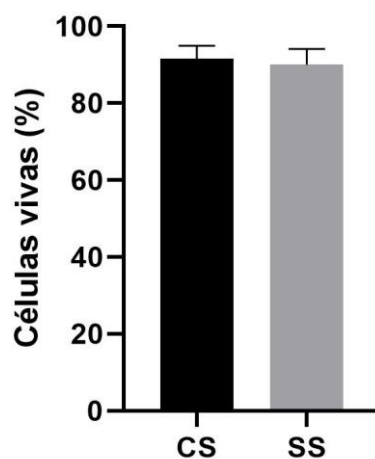
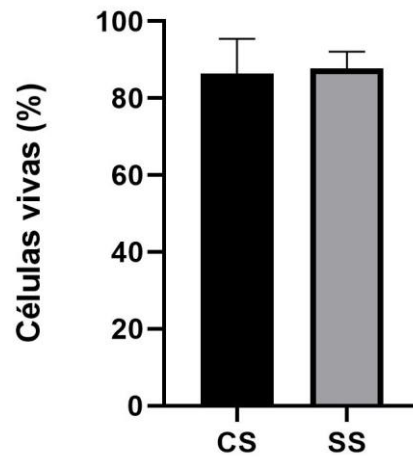
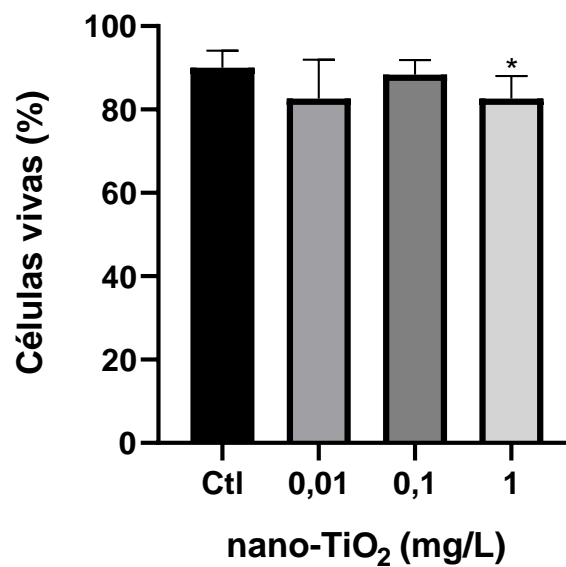


Figura 9 - Porcentagem de hemócitos vivos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 96 h de exposição. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, utilizando o teste de Welch.



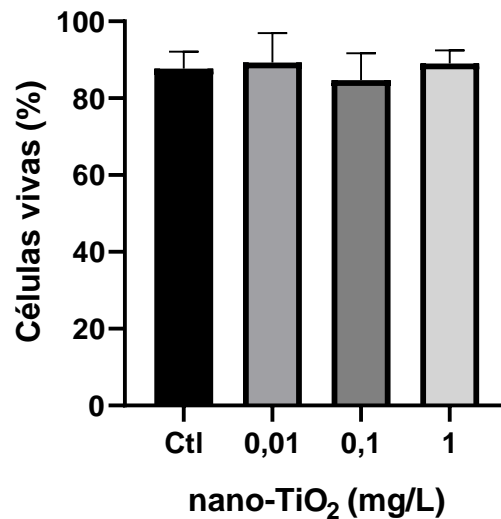
Nos grupos expostos às NPs, após 24 h, a porcentagem de células vivas variou de  $82,66\% \pm 9,3$  nos grupos com concentração de 0,01 e  $82,66\% \pm 5,4$  nos grupos com 1 mg/L a  $88,3 \pm 3,5$  nos grupos com concentração 0,1 mg / L ( $p=0,0305$ , teste de Kruskal-Wallis) de nano-TiO<sub>2</sub>. O grupo controle apresentou uma viabilidade celular de  $90,07\% \pm 4,07$ . (Fig 10).

Figura 10- Viabilidade celular após 24 h de exposição a diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>. Ctl = grupo controle. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. \* ( $p=0,0305$ ).



Após 96 h de exposição a porcentagem de hemócitos vivos variou de  $84,71\% \pm 7,01$  no grupo com  $0,1 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> a  $89,28\% \pm 7,66$  no grupo com  $0,01 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> (Fig. 11). O grupo controle apresentou uma viabilidade celular de  $87,74\% \pm 4,35$ . Neste tempo, não foi observada diferença na viabilidade celular entre as diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub> e o grupo controle.

Figura 11 - Viabilidade celular após 96 h de exposição a diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>. Ctl = grupo controle. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão, utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn não houve diferenças na porcentagem de células vivas.



#### 4.2.2.2.4 Efeito da exposição às nano-TiO<sub>2</sub> na concentração total de hemócitos

Na comparação dos dois grupos controles em 24 h após exposição, a média da CTH foi de  $9,73 \pm 4,69 \times 10^5$  hemócitos / mL no grupo com sedimento e  $8,80 \pm 2,64 \times 10^5$  no grupo sem sedimento (Fig 12). Após 96 h de exposição, a média da CTH foi de  $10,53 \pm 3,37 \times 10^5$  hemócitos/mL no grupo com sedimento e  $6,48 \pm 3,37 \times 10^5$  no grupo sem sedimento (Fig. 13). Não houve diferenças na concentração de hemócitos entre os dois grupos controles tanto em 24 quanto em 96 h.

Figura 12- Efeito da retirada do sedimento na concentração de hemócitos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 24 h. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. Não foi observada diferença nos dois grupos controles pelo teste de Welch.

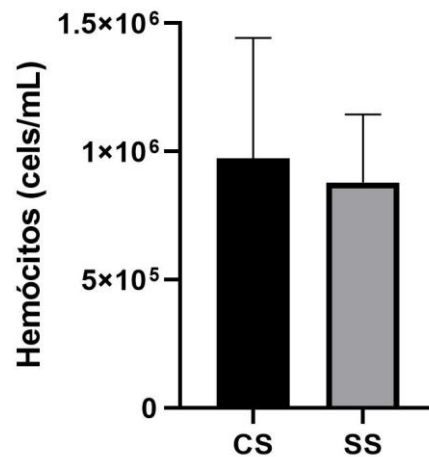
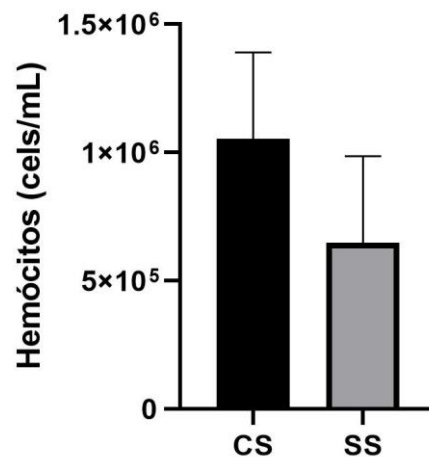


Figura 13- Efeito da retirada do sedimento na concentração de hemócitos entre o grupo controle com sedimento (CS) e o grupo controle sem sedimento (SS) em 96 h. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. Não foi observada diferença nos dois grupos controles pelo teste de Kolmogorov-Smirnov



Nos grupos de exposição, após 24 h, a média da CTH variou de  $7,78 \pm 1,46 \times 10^5$  no grupo exposto à  $0,01 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> à  $8,41 \pm 3,38 \times 10^5$  no grupo exposto à  $1,0 \text{ mg/L}$ . O grupo controle apresentou uma CTH de  $8,80 \pm 2,64 \times 10^5$  (Fig. 14). Após 96 h a média da CTH variou de  $4,90 \pm 2,65 \times 10^5$  no grupo exposto à  $1 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> à  $7,50 \pm 3,33 \times 10^5$  no grupo exposto à menor concentração de nano-TiO<sub>2</sub> (Fig. 15). Não foram observadas diferenças na concentração de hemócitos entre os grupos com exposição de nano-TiO<sub>2</sub> e o grupo controle tanto em 24 h como em 96 h de exposição.

Figura 14 - Efeito da nano-TiO<sub>2</sub> na concentração de hemócitos após 24 h de exposição. Ctrl = grupo controle. As barras correspondem a média ± desvio padrão. Após cálculo com ANOVA de uma via com pós teste de Dunnett, não foram observadas diferenças entre os grupos expostos e o controle.

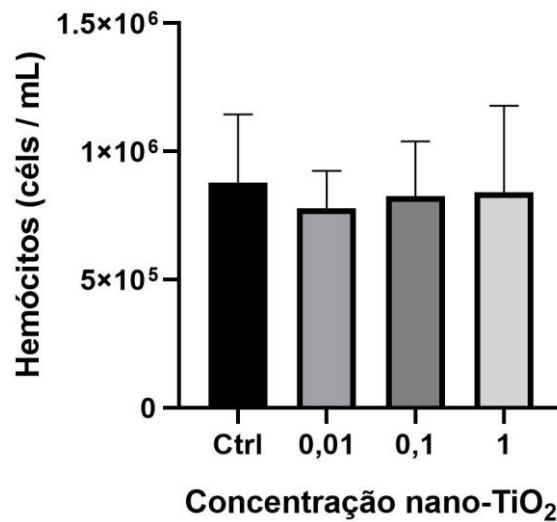
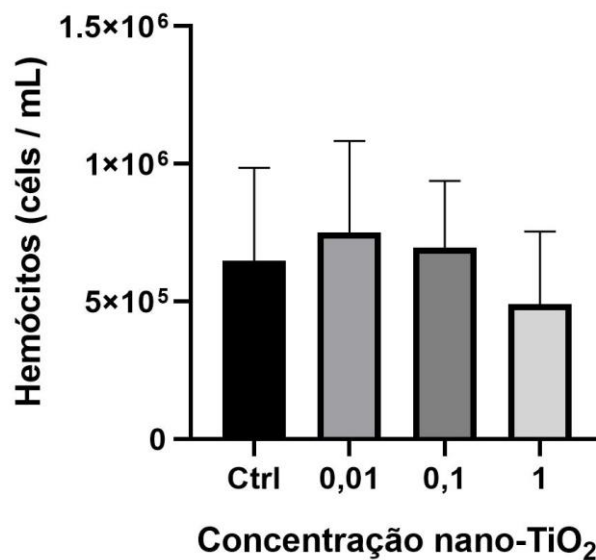


Figura 15 - Efeito da nano-TiO<sub>2</sub> na concentração de hemócitos após 96 h de exposição. Ctrl = grupo controle. As barras correspondem a média ± desvio padrão. Após cálculo com Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, não foram observadas diferenças entre os grupos expostos e o controle.



#### 4.2.2.2.5 Efeito da nano-TiO<sub>2</sub> na capacidade germicida

Na comparação dos dois grupos controles, após 24 h, a média da porcentagem de leveduras mortas por fagocitose foi de 44,45% ± 5,01 no grupo com sedimento e 30% ± 8,49 no grupo sem sedimento (Fig. 16). Após 96 h, a média da porcentagem de leveduras mortas por



fagocitose foi de  $12\% \pm 4$  no grupo com sedimento e  $13,33\% \pm 9,24$  no grupo sem sedimento (Fig. 17).

Nos grupos expostos às NPs, após 24 h, a média da porcentagem de leveduras mortas por fagocitose variou de  $24\% \pm 11,31$  no grupo com exposto à  $0,01 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> e  $36\% \pm 0,00$  no grupo exposto à  $1 \text{ mg/L}$  de nano-TiO<sub>2</sub> (Fig. 18). Após 96 h, a média da porcentagem de leveduras mortas por fagocitose variou de  $9,33\%$  em todos os grupos expostos à nano-TiO<sub>2</sub> com desvio-padrão de  $2,31$  para o grupo com  $0,01 \text{ mg/L}$  e  $1 \text{ mg/L}$  (Fig. 19).

Em função do baixo número de réplicas obtidas nesse experimento, não foi possível avaliar as diferenças estatísticas entre os diferentes grupos.

Figura 16- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose (n:25) comparando-se o controle com sedimento (CS) e o controle sem sedimento (SS) em 24 h. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão.

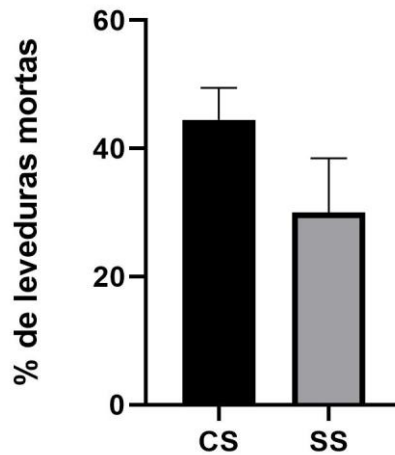


Figura 17- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose (n:25) comparando-se o controle com sedimento (CS) e o controle sem sedimento (SS) em 96 h. As barras correspondem a média  $\pm$  desvio padrão.

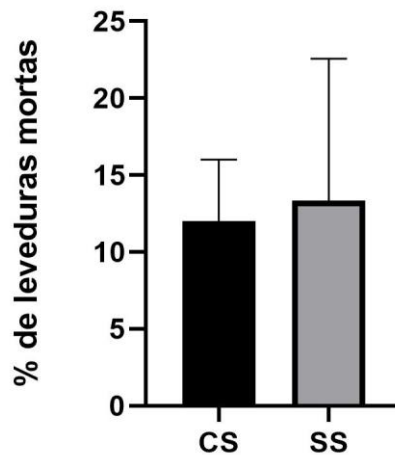


Figura 18 - Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose (n:25) nas diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>, em 24 h após exposição. Ctrl = grupo controle. As barras correspondem a média ± desvio padrão.

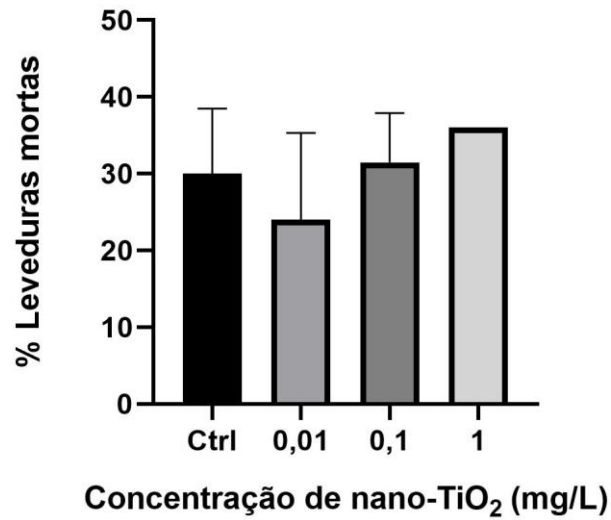
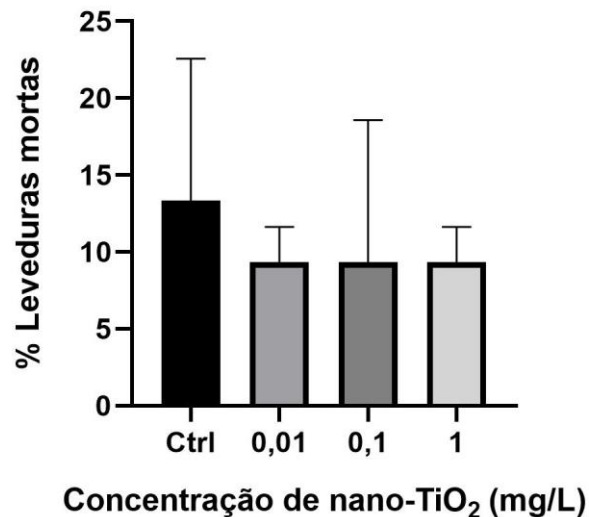


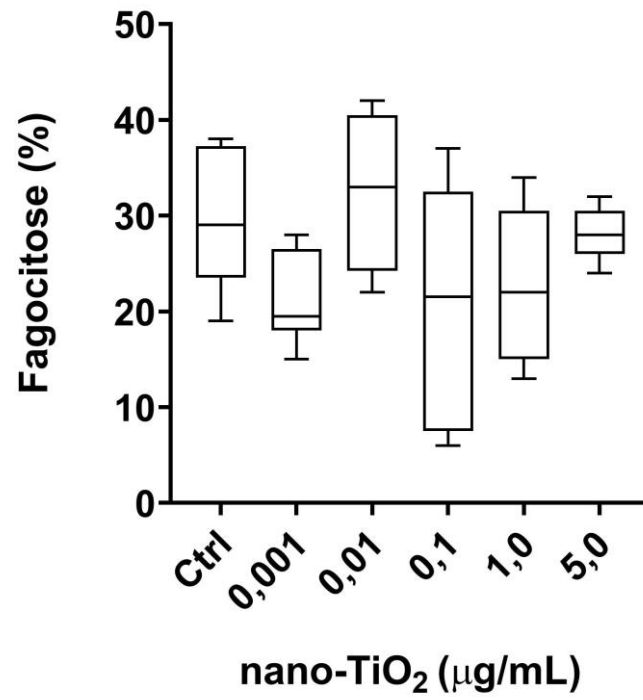
Figura 19- Porcentagem de leveduras mortas após ensaios de fagocitose (n:25) nas diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub>, em 96h após exposição. Ctrl = grupo controle. As barras correspondem a média ± desvio padrão.



#### 4.2.3 Exposição *in vitro*

A exposição às nano-TiO<sub>2</sub> não alterou o percentual de hemócitos que realizaram fagocitose quando comparados ao grupo controle (One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey). A porcentagem de células que realizaram fagocitose após 1 h de exposição variou de 20,83% ( $\pm 12,58$ ) no grupo 0,1  $\mu\text{g/mL}$  a 32,50% ( $\pm 7,94$ ) no grupo com 0,01  $\mu\text{g/mL}$  de nano-TiO<sub>2</sub>. O grupo controle apresentou uma taxa de fagocitose de 29,50% ( $\pm 7,23$ ) (Fig. 20).

Figura 20- Porcentagem de células que realizaram fagocitose nas diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub> após 1 h de exposição. Ctrl = grupo controle. As barras correspondem a média ± desvio padrão.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Parâmetros da Imunidade Inata Celular de *Amarillodema mactroides*

#### 5.1.1 Hemócitos

No presente estudo, foi possível identificar, por meio de microscopia ótica, apenas duas populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *A. mactroides*: granulócitos e hialinócitos, considerando a presença ou ausência de grânulos intracelulares visíveis pelas técnicas aqui utilizadas e afinidade aos corantes. Este dado está de acordo com o observado por Santos (2014) na mesma espécie. Além do marisco branco, outra espécie mais conhecida na literatura, o *Perna perna*, também apresenta apenas dois tipos celulares (BARRACCO; MEDEIROS; MOREIRA, 1999). No *Perna perna*, os granulócitos apresentaram grânulos citoplasmáticos abundantes eosinofílicos, enquanto que os hialinócitos apresentaram citoplasma basofílico, resultado semelhante ao observado no presente estudo. Porém, existem algumas espécies de bivalves, tais como *Mytilus edulis* e *Ensis siliqua*, que possuem três populações de hemócitos circulantes: eosinófilos granulares, basófilos granulares e basófilos agranulares (células hialinas), outras espécies como *Cerastoderma edule* apresenta, além das três populações anteriores, uma quarta população, os eosinófilos Tipo 'III' (WOOTTON; DYRYNDA; RATCLIFFE, 2003).

Informações mais precisas sobre as subpopulações de hemócitos de *A. mactroides*, seria possível somente com microscopia eletrônica, visto que os hemócitos desta espécie bivalve são muito pequenos.

Em relação à contagem diferencial das populações de hemócitos observadas, a população de granulócitos se mostrou prevalente em relação a de hialinócitos. Este dado corrobora com o observado por Santos (2014) em *A. mactroides*, porém no bivalve *Perna perna* a subpopulação prevalente é a de hialinócitos, representando aproximadamente 60% dos hemócitos (BARRACCO; MEDEIROS; MOREIRA, 1999).

#### 5.1.2 Capacidade Fagocítica

Em relação à capacidade fagocítica dos hemócitos de *A. mactroides*, a porcentagem média de fagocitose foi de 41% ( $\pm 0,03$ ). Na literatura não foram encontrados dados para a mesma espécie para uma possível comparação, enfatizando assim a importância dos nossos

dados. No entanto pode-se comparar com estudos de outras espécies de bivalves encontradas no Brasil. Barth, Moraes e Barracco (2005) utilizaram o zymosan, um glucano da parede celular de leveduras, em ensaios com a ostra *Crassostrea rhizophoraen* (habitante de manguezais e estuários) e observaram uma capacidade fagocitária de 69,5% dos hemócitos. Barracco, Medeiros e Moreira (1999) também observaram alta taxa de fagocitose do zymosan (aproximadamente 80% dos hemócitos) em *Perna perna* (coletados em Santa Catarina – Brasil), porém a mesma porcentagem não foi obtida quando foi utilizada a célula inteira (*S. cerevisiae*). Neste caso, foi evidenciada maior taxa de citoaderência da levedura na superfície dos hemócitos (51,4%) do que a sua completa ingestão (menos de 2% dos hemócitos). No presente trabalho, foram utilizadas somente leveduras *S. cerevisiae*, não sendo possível a comparação em relação ao zymosan, porém foram consideradas como fagocitadas apenas as leveduras internalizadas nos hemócitos e não as aderidas na superfície dos mesmos.

Outro ponto interessante a ser considerado é o ambiente onde os animais habitam. Santos e colaboradores (2018) observaram que bivalves de ambientes mais poluídos por esgotos apresentam maior densidade de hemócitos e atividade fagocítica de 6 a 8 vezes maior quando comparados à bivalves que habitam áreas não poluídas. Lembrando que os exemplares de *A. mactroides* utilizados neste trabalho foram coletados em uma área de preservação ambiental, portanto um ambiente menos poluído, o que pode explicar a taxa de fagocitose encontrada ser menor que das outras espécies dos estudos aqui citados.

## **5.2 Efeito agudo das nano-TiO<sub>2</sub> na imunidade de *A. mactroides***

### **5.2.1 Caracterização da nano-TiO<sub>2</sub>**

Na caracterização do comportamento da nano-TiO<sub>2</sub> na água do mar utilizada nos experimentos deste trabalho, observou-se uma maior agregação se comparada ao comportamento da mesma em água Milli-Q®. Esta agregação mostrou-se ser rápida, ocorrendo dentro de um período de 1 h.

Em relação ao tamanho alcançado pelas aglomerações da nano-TiO<sub>2</sub> na água do mar (FSW) utilizada nos experimentos deste trabalho ( $944,60 \pm 106,20$  nm em 5 µg/mL), não houve grande diferença do que foi observado por Della-Torre e colaboradores (2015), que utilizaram nano-TiO<sub>2</sub> do mesmo lote. Porém, em concentração acima (10 µg/mL) da utilizada no presente estudo.

O estado de dispersão de um sistema particulado é o quanto as partículas estão aglomeradas, ou seja, mantidas juntas umas das outras por forças atrativas entre elas (POWERS *et al.*, 2007). O valor de PDI é um índice que serve para medir a dispersão das nanopartículas em meio aquoso, ou em outras palavras, o quanto estas partículas estão aglomeradas. Na caracterização do presente estudo, o PDI em NSW foi  $>0,330$ , o que conota comportamento de grande aglomeração. Este dado é importante, visto que foi demonstrado que o tamanho dos aglomerados desempenha um papel importante na capacidade dos macrófagos de fagocitar partículas (POWERS *et al.*, 2007).

A medição do potencial zeta ( $\zeta$ ) de uma amostra é um indicador chave da estabilidade das dispersões coloidais. Partículas mais estáveis tem uma tendência menor a aglomerar (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018). A caracterização das nano-TiO<sub>2</sub>, no presente estudo, demonstrou que as partículas dispersas em água Milli-Q<sup>®</sup> apresentaram-se mais carregadas do que quando dispersas em FSW (potencial  $\zeta = -52,50 \pm 6,95$  versus potencial  $\zeta = -8,34 \pm 0,96$ , respectivamente). A diferença no potencial  $\zeta$ , em relação aos dois meios, pode ser atribuída à presença de íons na água do mar e a consequente interação, destes, com as NPs. Tais achados são corroborados pelo aumento da aglomeração, com o tamanho quatro vezes maior dos aglomerados da nano-TiO<sub>2</sub> em água do mar como visto na caracterização aqui apresentada, das nano-TiO<sub>2</sub> dispersas em FSW em comparação com as NPs dispersas em água Milli-Q<sup>®</sup>.

### 5.2.1.1 Análise de Titânio na Água do Mar

Mueller e Nowack (2008) calcularam que a quantidade de nano-TiO<sub>2</sub> estimada para o ambiente aquático está entre 0,7  $\mu\text{g} / \text{L}$  (em um cenário realístico) e 16  $\mu\text{g} / \text{L}$  (cenário de grande exposição), estes dados foram obtidos através de uma projeção de produção mundial, liberação de partículas de produtos e coeficientes de fluxo dentro dos compartimentos ambientais. Em nossa análise, só foi possível analisar a quantidade de titânio total nas amostras. Parte deste titânio poderia estar na forma de dióxido, mas após o tratamento das amostras com ácido nítrico, pode ter ocorrido quebra da ligação química. Se considerarmos que o titânio total estava em uma concentração abaixo do limite de detecção do aparelho ( $<0,01 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), o dióxido de titânio, se presente nas amostras, estaria em concentração ainda inferior. Ao se comparar os dois trabalhos, é preciso considerar as diferentes metodologias, e as diferentes localidades, sendo o dado trazido pelo presente trabalho relevante para a localidade em questão, pois não foi encontrada a informação prévia a respeito.

### 5.2.2 Exposição *in vivo*

Não foi observada diferença ( $p>0,05$ ) na retirada do sedimento na imunidade dos animais, no que se refere à viabilidade celular e contagem total de hemócitos. Esse dado valida a não utilização de sedimento nos ensaios experimentais de exposição às nano-TiO<sub>2</sub>.

Nos experimentos de toxicidade das nano-TiO<sub>2</sub>, houve redução na porcentagem de hemócitos vivos expostos à concentração mais alta de nano-TiO<sub>2</sub> (1 mg/L) em relação ao grupo controle após 24 h de exposição, porém nenhuma diferença foi observada após 96 h de exposição em nenhuma das concentrações testadas. Coleau e colaboradores (2012) observaram ausência de efeito significativo na viabilidade dos hemócitos de *Dreissena polymorpha* (um bivalve de água doce) após exposição às nano-TiO<sub>2</sub> por 24 h nas concentrações 0,1, 1, 5 e 25 mg/L, sugerindo que este parâmetro talvez não seja o mais ideal para avaliar a resposta de uma exposição aguda às nano-TiO<sub>2</sub>. Wang e colaboradores (2019) observaram efeitos dependentes da concentração (0,1, 1, 10 mg/L) na mortalidade dos hemócitos de *M. coruscus* (bivalve marinho) após o terceiro dia de exposição. Já Dalai e colaboradores (2013) observaram que a concentração disponível (partículas em suspensão) de NPs diminui com o tempo e com a concentração, isso devido a agregação através do tempo, o que poderia explicar o porquê foi observado diminuição na viabilidade dos hemócitos em 24 h, mas não após 96 h de exposição. Porém, apesar da concentração disponível diminuir, através do tempo, o tamanho dos aglomerados aumenta, fazendo com que se acumulem no fundo, o que facilitaria a ingestão por animais filtradores que vivem no sedimento.

No que diz respeito à concentração total de hemócitos não houve diferença dos grupos experimentais em relação ao controle nem em 24 quanto em 96 h de.

Uma hipótese para tentar explicar a ausência de efeito imunotóxico entre os grupos tratados e os controles, no que se refere ao número total de hemócitos, foi que a concentração de nano-TiO<sub>2</sub> foi muito baixa e, portanto, não imunotóxica para os animais. Porém, Barmo e colaboradores (2013) observaram, por citometria de fluxo, queda no número total de hemócitos do bivalve *Mytilus galloprovincialis*, após 96 h de exposição à nano-TiO<sub>2</sub> nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L. Já Marisa e colaboradores (2018) observaram aumento no número total de hemócitos de *Ruditapes philippinarum* (bivalve marinho) em 0,001 e 0,01 mg/L de nano-TiO<sub>2</sub> a partir de 72 h após exposição. Esses dados mostram reações diferentes entre os organismos de diferentes espécies, sendo que em uma espécie a exposição de nano-TiO<sub>2</sub> causou aumento

no número de hemócitos e na outra causou a diminuição. Os efeitos destes estudos foram a partir de 72 h de exposição, o que poderia explicar a falta de efeito imunotóxico em 24 h de exposição, mas não em 96 h. Porém, Couleau e colaboradores (2012) observaram efeitos imunotóxicos no bivalve *Dreissena polymorpha* já em 24 h de exposição à nano-TiO<sub>2</sub> em concentrações de 0,1, 1, 5 e 25 mg/L.

No trabalho de Wang e colaboradores (2019), relaciona-se os efeitos tóxicos no bivalve *Mytilus coruscus*, a dois diferentes tamanhos de nano-TiO<sub>2</sub>. Foi observado que as nano-TiO<sub>2</sub> de tamanho de 25 nm foram mais tóxicas que as nanopartículas de 100 nm nos parâmetros imunes de contagem total de hemócitos, índice de mortalidade das células, entre outros. O tamanho das nano-TiO<sub>2</sub> utilizada neste trabalho é do mesmo lote da utilizada no trabalho de Della-Torre e colaboradores (2015), onde o diâmetro médio da nanopartícula é de  $24 \pm 7$  nm. Como as nanopartículas menores tendem a ser mais tóxicas, este argumento não pode ser utilizado para explicar a ausência de efeito imunotóxico no presente trabalho até o momento.

As diferenças observadas podem ser espécie-específicas, contudo, foram observados efeitos imunotóxicos em três diferentes espécies: *M. galloprovincialis*, *R. philippinarum* e *D. polymorpha*. É importante ressaltar que *D. polymorpha* é um bivalve de água doce, e segundo Handy, Owen e Valsami-Jones (2008), o comportamento da maioria das NPs manufaturadas é diferente na água do mar em comparação com a água doce, sendo a agregação na água do mar mais provável, o que foi confirmado pela caracterização aqui apresentada; portanto, a toxicidade também pode ser diferente.

No tempo de 96 h observou-se uma queda geral (inclusive no grupo controle) na concentração total de hemócitos, lembrando que não foi possível a análise estatística dos dados. Uma hipótese é que esta queda na concentração total de hemócitos, seja causada pela falta de alimento ou aumento da concentração de amônia na água, visto que os animais não foram alimentados, nem a água foi renovada durante os tempos de exposição. Pensando nisso, decidiu-se pela realização de testes de exposição *in vitro*, desta forma, seria possível verificar se os hemócitos são sensíveis à exposição direta das nano-TiO<sub>2</sub>, e eliminaria o fator falta de alimento e aumento da concentração de amônia do aquário durante tempos de exposição mais longos.

### 5.2.3 Exposição *in vitro*

Não foram observados efeitos na capacidade fagocítica dos hemócitos expostos às diferentes concentrações de nano-TiO<sub>2</sub> por um período de 1 hora. Ressalta-se que nos testes de



exposição *in vitro*, foram testadas uma gama maior de concentrações, inclusive uma maior, de 5 µg/mL. No trabalho de Marisa e colaboradores (2015), cujo protocolo é muito semelhante ao realizado no trabalho aqui apresentado, observou-se a diminuição na porcentagem de fagocitose nas duas concentrações utilizadas (1 e 10 µg/ml). O tempo de exposição de ambos os experimentos foi o mesmo e uma das concentrações (1 µg/ml) também, porém *A. mactroides* respondeu de forma diferente do bivalve utilizado por Marisa e colaboradores (2015), sugerindo que as diferenças podem ser específicas de cada espécie.

Os experimentos, e as exposições *in vitro* do presente trabalho foram realizados no escuro. Xiong e colaboradores (2013) observaram que as nano-TiO<sub>2</sub>, quando expostas à luz UV visível, tornam-se mais tóxicas quando comparadas às que não foram fotoativadas. Os autores notaram, também, que o aumento da toxicidade pela fotoativação é maior em partículas menores (10 nm) quando comparadas às de maior tamanho (20 e 100 nm) devido a área de superfície ser maior nas partículas menores. Este fenômeno pode explicar o porquê não foi observado, no presente trabalho, diferenças na capacidade fagocítica dos grupos tratados com o controle. Em relação ao trabalho de Marisa e colaboradores (2015) não foi possível saber se as exposições foram em condição de luz UV ou no escuro.

Outro ponto a ser levantado, é a interação das NPs com constituintes da água do mar (íons, oligoelementos ou matéria orgânica) (CORSI.; BERGAMI; GRASSI, 2020). A interação com constituintes do meio, e a consequente aglomeração das nano-TiO<sub>2</sub>, podem ter reduzido a sua disponibilidade para os organismos, e consequentemente, reduzido a sua toxicidade. A mudança no potencial ζ e o aumento no tamanho dos aglomerados das nano-TiO<sub>2</sub> (quatro vezes maior em FSW) fortalecem esta hipótese. Segundo Dalai e colaboradores (2013), pode-se presumir que a agregação de NPs pode reduzir a sua citotoxicidade. Porém, esta mesma agregação pode limitar a mobilidade das NPs no ambiente e facilitar a ingestão ou adesão das mesmas nos organismos aquáticos, principalmente animais que vivem no substrato.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível observar dois tipos celulares granulócito e hialinócito e a quantidade de cada um presente na hemolinfa do marisco branco, assim como mensurar a taxa de fagocitose em condições normais. Importante dado, visto que a fagocitose é a via de internalização das NPs.

Através da caracterização das nanopartículas foi possível entender o seu comportamento nos diferentes meios, e a grande aglomeração que sofre quando em água do mar, alterando seu potencial de reatividade e biodisponibilidade.

Em relação à avaliação dos efeitos da nano-TiO<sub>2</sub>, foi possível observar efeito imunotóxico somente na viabilidade dos hemócitos da exposição *in vivo*, na maior concentração testada e em 24 h. Nos demais parâmetros não foi observado mais nenhum efeito imunotóxico. Os fatos observados podem ser uma resposta específica da espécie, que pode ser mais resistente comparadas às outras, e porque as concentrações aqui utilizadas foram mais próximas da concentração ambiental.

O presente trabalho contribui com a expansão do conhecimento existente sobre imunidade bivalve e imunotoxicologia das NPs para uma espécie diferente das comumente utilizadas. Por se tratar de uma espécie ainda pouco estudada, e a problemática do impacto das NPs no ecossistema costeiro pouco conhecido, sugere-se mais estudos para o aprofundamento do tema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAISHI, F. M.; ST-JEAN, S. D.; BISHAY, F.; CLARKE, J.; RABITTO, I. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, v.82, p.1–14, 2007.
- ALLAM, B.; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.131, p.121-136, 2015.
- AMARAL, A. C. Z.; NALLIN, S. A. H. (Org.), 2011. *Biodiversidade e ecossistemas bentônicos marinhos do Litoral Norte de São Paulo*, Sudeste do Brasil. 1. ed. Campinas (SP): UNICAMP/IB, p. 573.
- BARMO C.; CIACCI C.; CANONICO B.; FABBRI R.; CORTESE K.; BALBI T.; MARCOMINI A.; POJANA G.; GALLO G.; CANESI L. *In vivo* effects of n-TiO<sub>2</sub> on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, p.132–133, 2013.
- BARRACCO, M. A.; MEDEIROS, I. D.; MOREIRA, F. M. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish & Shellfish Immunology*, v.9, p.387–404, 1999.
- BARTH, T.; MORAES, N.; BARRACCO, M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. *Aquat. Living Resour.* v.18, p.179–186, 2005.
- BAUN, A.; HARTMANN, N. B.; GRIEGER, K.; KUSK, K. O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, v.17, p.387–395, 2008.
- BERGONCI P. E. A. *Aspectos da dinâmica populacional do marisco branco Mesodesma mactroides Deshayé, 1854 (Mollusca Bivalvia) em praias arenosas exposta do Rio Grande do Sul*. 2005. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BORGES, J. C. S.; PORTO-NETO, L. R.; MANGIATERRA, M. B. C. D.; JENSCH-JUNIOR, B. E.; SILVA, J. R. M. C. Phagocytosis *in vivo* and *in vitro* in the Antarctic Sea Urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner) at 0°C, *Polar Biology*, v.25 p.891-897, 2002.
- BRANDÃO, C. J.(Org), 2011. *Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; - São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, p.327.*
- CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The Science of the Total Environment* v.247, p.295- 311, 2000.

CANESI, L.; CIACCI, C.; BERGAMI, E.; MONOPOLI, M.P.; DAWSON, K.A.; PAPA, S.; CANONICO, B.; CORSI, I. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine Environmental Research* v.111, p.34-40, 2015.

CANESI, L.; CIACCI, C.; FABBRI, R.; MARCOMINI, A.; POJANA, G.; GALLO, G. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine environmental research*. v.76. p.16-21, 2012.

CANESI, L.; CIACCI, C.; VALLOTTO, D.; GALLO, G.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. *In Vitro* Effects of Suspensions of Selected Nanoparticles (C60 Fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic toxicology*, v.96, p.151-158, 2010a.

CANESI, L.; CORSI, I. Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Science of The Total Environment*, v.565, p.933-940, 2016.

CANESI, L.; FABBRI, R.; GALLO, G.; VALLOTTO, D.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>), *Aquatic Toxicology*, v.100, p.168-177, 2010b.

CARVALHO, Y. B. M.; ROMANO, L. A.; POERSCH, L. H. S. Effect of low salinity on the yellow clam *Mesodesma mactroides*. *Brazilian journal of biology*. v.75, p.8-12, 2015.

CORAY, C.; ST-JEAN, S. D.; BARD, S. M. Immunomodulation in Blue Mussels (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) Exposed to Municipal Effluent in Eastern Canada. *Water Quality Research Journal*. Canada, v.42, p.194-201, 2007.

CORSI, I.; BERGAMI, E.; GRASSI, G. Behavior and Bio-Interactions of Anthropogenic Particles in Marine Environment for a More Realistic Ecological Risk Assessment. *Frontiers in Environmental Science*, v.8, 2020.

CORSI, I.; CHERR, G. N.; LENIHAN, H. S.; LABILLE, J.; HASSELLOV, M.; CANESI, L.; DONDERO, F.; FRENZILLI, G.; HRISTOZOV, D.; PUNTES, V.; DELLA TORRE, C.; PINSINO, A.; LIBRALATO, G.; MARCOMINI, A.; SABBIONI, E.; MATRANGA, V. Common Strategies and Technologies for the Ecosafety Assessment and Design of Nanomaterials Entering the Marine Environment. *ACS Nano* v.8, p.9694-9709, 2014.

COSTA, R. N.; JANKOWSKY, M.; MOURA, C. Criação de áreas protegidas municipais como avanço na política de planejamento e conservação territorial: o caso do município de Ilha Comprida, São Paulo, Brasil. Congresso de Geografia Tropical - Convención Tropicó, Havana, Cuba, 2016.

COULEAU, N.; TECHER, D.; PAGNOUT, C.; JOMINI, S.; FOUCAUD, L.; LAVAL-GILLY, P.; FALLA, J.; BENNASROUNE, A. Hemocyte responses of *Dreissena Polymorpha* following a short-term *in vivo* exposure to titanium dioxide nanoparticles: preliminary investigations. *Sci. Total Environ.* v.438, p. 490–497, 2012.

- DALAI, S.; PAKRASHI, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Acute Toxicity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *Plos one*, v.8, n.4, 2013.
- DEFEO, O.; SCARABINO, V. Ecological significance of a possible deposit-feeding strategy in *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854) (Mollusca: Pelecypoda). *Atlantica.*, v.12. p. 55-65, 1990.
- DELAPORTE, M., SOUDANT, P., MOAL, J., LAMBERT, C., QUERE, C., MINER, P., CHOQUET, G., PAILLARD, C., SAMAIN, J.F. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Biol.* v.206, p.3053–3064, 2003.
- DELLA TORRE, C.; BALBI, T.; GRASSI, G.; FRENZILLI, G.; BERNARDESCHI, M.; SMERILLI, A.; GUIDI, P.; CANESI, L.; NIGRO, M.; MONACI, F.; SCARCELLI, V.; ROCCO, L.; FOCARDI, S.; MONOPOLI, M.; CORSI, I. Titanium dioxide nanoparticles modulate the toxicological response to cadmium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials* v.297, p. 92–100, 2015.
- DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, v.44, p.842–852, 2002.
- DYRYNDA, E. A.; LAW, R. J.; DYRYNDA, P. E. J.; KELLY, C. A.; PIPE, R. K.; RATCLIFFE, N. A. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK). *Mar Ecol Prog Ser*, v.206, p.155–170, 2000.
- FARRÉ, M.; GAJDA-SCHRANTZ, K.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem*, v.393, p.81–95, 2009.
- FIORI, S.; DEFEO, O. Biogeographic Patterns in Life-History Traits of the Yellow Clam, *Mesodesma mactroides*, in Sandy Beaches of South America. *Journal of Coastal Research*, v.22. p.872-880, 2006.
- FRASER, M.; RAULT, P.; ROUMIER, P-H.; FORTIER, M.; ANDRÉ, C.; BROUSSEAU, P.; GAGNÉ, F.; FOURNIER, M.; SURETTE, C.; VAILLANCOURT, C. Decrease in phagocytosis capacity of hemocyte during spawning in *Mytilus edulis*: a pilot study. *Journal of Xenobiotics*. v.3, n.1, 2013.
- GRIETA, V.; LISBETH, V. C.; COLIN R., J.; ANTONIO, M.; KIT, G.; GABRIELLA, F.; MICHIEL J.J.K.; JORGE, D.; KAREN, B.; JOHANA, R.; LISA, D. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, v.143, p.46–55, 2015.
- HAMZA-CHAFFAI, A. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, v.3, p.19-26, 2014.

- HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, v.17, p.315–325, 2008.
- HEWITT, J. E.; ANDERSON, M. J.; THRUSH, S. F. Assessing and monitoring ecological community health in marine systems. *Ecological Applications*, v.15, p.942–953, 2005.
- JIANG, J.; OBERDORSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res.* v.11, p.77–89, 2009.
- JOHNSON, B. D.; GILBERT, S. L.; KHAN, B.; CARROLL, D. L.; RINGWOOD, A. H. Cellular responses of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, to titanium dioxide nanoparticles. *Marine Environmental Research*, v.111, p. 135 -143, 2015.
- KHAN, R. A.; THULIN, J. Influence of pollution on parasites of aquatic animals. *Advances in Parasitology*, v.30, p.210–238, 1991.
- KLAINÉ, S. J.; ALVAREZ, P. J. J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R. D.; LYON, D.Y.; MAHENDRA, S.; MCLAUGHLIN, M. J.; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n.9, p.1825–1851, 2008.
- LIVINGSTONE, D. R.; PIPE, R. K. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects, *In: The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam, p.425-464. 1992.
- MARISA, I.; MARIN, M. G.; CAICCI, F.; FRANCESCHINIS, E. ; MARTUCCI, A.; MATOZZO, V. *In vitro* exposure of haemocytes of the clam *Ruditapes philippinarum* to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles: Nanoparticle characterisation, effects on phagocytic activity and internalisation of nanoparticles into haemocytes. *Marine Environmental Research*, v.103, p.11-17, 2015.
- MARISA, I.; MATOZZO, V.; MARTUCCI, A.; FRANCESCHINIS, E.; BRIANESE, N.; MARIN, M. G. Bioaccumulation and effects of titanium dioxide nanoparticles and bulk in the clam *Ruditapes philippinarum*, *Marine Environmental Research*, v.136, p.179-189, 2018.
- MATOZZO, V.; MARIN, M. G. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology*. v.28, p.534–541, 2010.
- MAYRAND, E.; ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S. C. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? *Aquaculture Research*, v.36, p.962-971, 2005.
- MCCARTY, L.S.; MUNKITTRICK, K.R. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Hum Ecol Risk Assess.* v.2, p.:268-274, 1996.

- MEADOR, J. P., STEIN, J. E., REICHERT, W. L.; VAANASI, U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. and Toxicol.*, v.143, p.79–165, 1995.
- MEARNS, A. J.; REISH, D. J.; OSHIDA, P. S.; GINN, T.; REMPEL-HESTER, M. A.; ARTHUR, C.; RUTHERFORD, N.; PRYOR, R. Effects of Pollution on Marine Organisms. *Water Environ Res.* v.87, n.10, p.1718-1816, 2015.
- MELLO, D. F.; PROENÇA, L. A. O.; BARRACCO, M. A. Comparative Study of Various Immune Parameters in Three Bivalve Species during a Natural Bloom of *Dinophysis acuminata* in Santa Catarina Island, Brazil. *Toxins*, v.2, p.1166-1178, 2010.
- MINETTO D.; LIBRALATO G.; VOLPI GHIRARDINI, A. Ecotoxicity of engineered TiO<sub>2</sub> nanoparticles to saltwater organisms: an overview. *Environment International*, v.66, p.18-27, 2014.
- MOTTIER, A.; MOUCHET, F.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L.; FLAHAUT, E. Environmental impact of engineered carbon nanoparticles: from releases to effects on the aquatic biota. *Current Opinion in Biotechnology.*, v.46, p.1-6, 2017.
- MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale*, v.10, p.12871-12934, 2018.
- MUELLER, N. C. NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol.* v.42 p.4447-4453, 2008.
- NEL A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, v.311, p.622–627, 2006.
- PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science*, v.9, p.1-9, 2016.
- PINTO, L. P. Alterações Morfológicas Induzidas por Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO<sub>2</sub>) durante o Desenvolvimento do Ouriço-do-Mar Tropical *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
- POWERS, K.W.; PALAZUELOS, M.; MOUDGIL, B. M.; ROBERTS, S. M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology*, v.1, n.1 p.42-51, 2007.
- PRIYA, A. K.; SAMUEL ANTONY.; SANTOS KUMAR, G. M; SIVAMOORTHY, S; VINEESH, S. Anthropogenic impacts on the contamination in the coastal region: A review. *Materials Today: Proceedings*, v.37, p.2236–2238, 2021.
- PULIT-PROCIAK, J.; BANACH, M. Silver Nanoparticles—A Material of the Future...? *Open Chem.*, v.14, 2016.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantã*. v.20, p. 329-334, 1947.

SANTOS, J. J. S. Perfil Imunológico do Marisco Branco *Mesodesma mactroides* (MESODESMADIDAE) do Litoral do Sul do Rio Grande do Sul. 2014. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SHARMA, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S.; NAUSHAD, M.; DWIVEDI, R. P.; ALOTHMAN, Z. A.; MOLA, G. T. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: *Journal of King Saud University – Science*, v.31, p.257–269, 2019.

SILVA, J. R. M. C. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. *Journal of Developmental and Comparative Immunology*.v.24 p.733-739, 2000.

SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J.C.S. Comparative study of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis including germicide capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C Phagocytosis of *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C, *Journal of Invertebrate Pathology*.v.77, p.180-185, 2001.

SWARTZWELTER, B. J.; MAYALL, C.; ALIJAGIC, A.; BARBERO, F.; FERRARI, E.; HERNADI, S.; MICHELINI, S.; PACHECO, N. I. N.; PRINELLI, A.; SWART, E.; AUGUSTE, M. Cross-Species Comparisons of Nanoparticle Interactions with Innate Immune Systems: A Methodological, Review. *Nanomaterials*, v.11, n.1528, 2021.

UNEP. Marine pollution. *UNEP Regional Seas Reports and Studies*, n. 25, 1982.

WANG, Y.; HU, M.; LI, Q.; LI, J.; LIN, D.; LU, W. Immune toxicity of TiO<sub>2</sub> under hypoxia in the green-lipped mussel *Perna viridis* based on flow cytometric analysis of hemocyte parameters, *Science of The Total Environment*, v.470–471, p.791-799, 2014.

WANG, T.; HUANG, X.; JIANG, X.; HU, M.; HUANG, W.; WANG, Y. Differential *in vivo* hemocyte responses to nano titanium dioxide in mussels: Effects of particle size. *Aquatic Toxicology*, v.212, p.28–36, 2019.

WIDDOWS, J.; DONKIN, R. Mussel and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. In: *The Mussel Mytilus edulis; ecology physiology, genetic and culture*. Elsevier, Amsterdam, p: 283–425, 1992.

WILLIS, K. A.; SERRA-GONÇALVES, C.; RICHARDSON, K.; SCHUYLER, Q. A.; PEDERSEN, H.; ANDERSON, K.; STARK, J. S.; VINCE, J.; HARDESTY, B. D.; WILCOX, C.; NOWAK, B. F.; LAVERS, J. L.; SEMMENS, J. M.; GREENO, D.; MACLEOD, C.; FREDERIKSEN, N. P. O.; PUSKIC, P. S. Cleaner seas: reducing marine pollution. *Rev Fish Biol Fisheries*, 2021

WOOTTON, E. C; DYRYNDA, E. A.; RATCLIFFE, N. A. Bivalve immunity: Comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & shellfish immunology*. v.15. p.195-210, 2003.



XIONG, S.; GEORGE, S.; JI, Z.; LIN, S.; YU, H.; DAMOISEAUX, R.; FRANCE, B.; NG, K. W.; LOO, S. C. J. Size of TiO<sub>2</sub> nanoparticles influences their phototoxicity: an *in vitro* investigation. *Arch Toxicol.* v.87, p.99-109, 2013.

ZHOU, Y.; GU, W.; TU, D.; ZHU, Q.; ZHOU, Z.; CHEN, Y.; SHU, M. Hemocytes of the mud crab *Scylla paramamosain*: Cytometric, morphological characterization and involvement in immune responses. *Fish and shellfish immunology.* v.72, p.459-469, 2018.