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

LETÍCIA PALMEIRA PINTO

Alterações Morfológicas Induzidas por Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO_2) durante o Desenvolvimento do Ouriço-do-Mar Tropical *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)

São Paulo - SP
2021

LETÍCIA PALMEIRA PINTO

Alterações Morfológicas Induzidas por Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO_2) durante o Desenvolvimento do Ouriço-do-Mar Tropical *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)

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. Versão corrigida.

Área de Concentração: Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. Jose Roberto Machado Cunha da Silva
Coorientador: Prof. Luís Fernando Marques dos Santos

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)

Palmeira Pinto, Letícia
Alterações Morfológicas Induzidas por Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO2) durante o desenvolvimento do Ouriço-do-Mar Tropical Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) / Letícia Palmeira Pinto; orientador José Roberto Machado Cunha da Silva; coorientador Luis Fernando Marques Santos. -- São Paulo, 2021.
67 p.

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

1. Nanopartículas . 2. Dióxido de Titânio. 3. Ecotoxicologia . 4. Desenvolvimento embrionário . 5. Lytechinus variegatus. I. Machado Cunha da Silva, José Roberto, orientador. II. Marques Santos, Luis Fernando, coorientador. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PINTO, Letícia Palmeira

Título: Alterações Morfológicas Induzidas por Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO_2) durante o Desenvolvimento do Ouriço-do-Mar Tropical *Lytechinus variegatus* (Larmarck, 1816)

Dissertação apresentada ao Insttituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

COMPROVANTE DE ISENÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **918/2017** referente ao projeto intitulado: ***"Efeito de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO2) durante o desenvolvimento de embriões do ouriço-do-mar tropical Lytechinus variegatus"*** sob a responsabilidade de ***Letícia Palmeira Pinto*** 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 de 2012.

São Paulo, 21 de novembro de 2017.

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

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Pelo carinho, afeto e todo o apoio que nunca me faltou, dedico aos meus Pais, Rosimeire e Marco Antonio, e a minha avó Senhorinha (*in memoriam*) com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, que me deu e me dá forças todos os dias para não desistir dos meus sonhos e objetivos, por todas as oportunidades que eu tive, e cada dificuldade também, pois me ajudaram a crescer e me tornar a pesquisadora que sou hoje.

À minha mãe, uma mulher maravilhosa, sábia e com o coração mais lindo que eu já vi. Mãe, o seu apoio por todo o meu mestrado foi essencial, pois cada momento de apreensão e tensão eu só queria ligar para você e escutar sua voz calma para me transmitir paz. Te agradeço por todas as dúvidas de matemática que me salvaram que você tirou comigo por telefone (porque eu sei que você não gosta hahaha). Ao meu pai, meu amor e meu porto seguro, sempre me deu todo o apoio e estrutura para conseguir fazer tudo, eu não tenho palavras para agradecer. À minha segunda mãe de coração, Lúcia, por todo o amor e carinho que tem por mim sempre me apoiando.

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. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos, meu coorientador e professor, eu te agradeço imensamente por todo o conhecimento compartilhado tanto na bancada de laboratório quanto nas correções dos meus relatórios e dissertação. Você é um orientador muito querido e eu tenho muita sorte de ter a chance de aprender tanto com você.

À Prof. Ilaria Corsi, minha colaboradora, agradeço muito por todo o suporte que me deu desde o primeiro contato por e-mail, por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Siena de portas abertas e com o maior carinho e atenção. Agradeço todos os ensinamentos, orientação e correção do meu projeto e manuscrito.

Ao Dr. Andrews Krupinski Emerenciano, meu amigo irmão. Jovis, não tenho palavras para descrever a sua importância durante todo o meu mestrado, tanto para a minha vida academica quanto na vida pessoal. Toda a sua orientação na minha pesquisa desde o começo foi o que fez tudo funcionar. Foram muito perrengues e muuuitas gambiarras, muitos momentos tensos e momentos divertidos, muitas noites viradas comigo fazendo experimentos, limpando laboratório, descendo o morro do CEBIMar de madrugada para fixar os plútos fofos hahahah. Obrigada por sempre me acolher. Você foi uma das melhores pessoas que eu conheci na USP. Amo você.

À PhD Elisa Bergami, a italiana mais fofa que eu já conheci! Te agradeço muito por toda a orientação que você me deu, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas sempre ter a maior

atenção para corrigir e ajudar no meu trabalho, e me incentivar sempre! Por toda a paciência de me ensinar técnicas de laboratório quando eu não sabia direito, sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar com você no começo do meu mestrado, aprendi muito em bancada e continuo aprendendo muito intelectualmente com você Eli. Baci!

Ao MSc Willian Reina Joviano, meu parceiro dos maiores perrengues desde a faculdade, iniciação científica e mestrado (que no começo ainda nos sentíamos ICs na segunda temporada hahhahha), meu amigo irmão! Uiu, te agradeço por todo o apoio que você já me deu de todas as formas, em momentos de desespero, de felicidade, de tristeza e de vitórias, quero muito o seu bem, sempre! Amo você.

À Amanda Ribeiro Rosa, minha amiga que também passou muitos perrengues no laboratório comigo, muitas noites sem dormir em experimentos ou tentando entender artigos de Biomol hahahahah. Por toda a ajuda e suporte que você sempre me deu durante essa jornada, por me lembrar das coisas porque eu sou desligada hahaha e por sempre ter me acolhido nas suas casas, sou muito grata, Manda!

À MSc Camila Lima Neves, “maaaano, é que você joga bola né?” Hahhahha Camis, te agradeço imensamente por todas as vezes que você me salvou indo ao CEBIMar comigo para virar noites em experimento, sou muito grata por todo o suporte sempre cheio de alegria e bom humor que você me deu dentro e fora do laboratório!

Ao Felipe da Costa Souza, meu amigo que admiro demais! Fe, obrigada por sempre me ajudar com problemas estatísticos e com problemas da vida hahahah obrigada por toda a paciência que você sempre tem de sobra, e sempre dividir os seus conhecimentos. Você faz muita falta aqui no Brasil, saudades enormes do seu abraço.

À Giselle Araújo Santos, minha irmã do coração. Migles, eu não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez e faz por mim, eu te agradeço por todas as horas no telefone me apoiando e me incentivando, por todos os álcools compartilhados, e por sempre me fazer companhia por vídeo chamada quando eu to caçando o que comer ou me sentindo só. Quando eu preciso de um conforto, eu sempre penso em você! Eu te amo muito!

À MSc Cecília Gallottini de Magalhães, minha amiga esquilo cientista maravilhosa. Cecis, sou muito grata por toda a sua amizade e ajuda que você me deu nesse mestrado. Foram muitas vezes que eu fui te pedir socorro na porta do lado e você sempre estava lá, mesmo ocupada você dava um jeito para ajudar. Obrigada por tudo!

À Camila Felix de Lima Fernandes, uma grande amiga e cientista que eu admiro muito! Cami, sou muito grata por toda a ajuda que você me deu, e por ter tido a oportunidade de fazer a disciplina mais difícil de todas com você hahhhah por sempre ter paciência e vontade de dividir os seus conhecimentos comigo. Tenho muito carinho por você!

À MSc Jimena García Rodrígues, a mimis mais mimi de todas hahaahh Jimes, você é a melhor espanhola que eu conheço, te agradeço por todos os momentos que você esteve comigo, pelas praaaias, momentos divertidos e também tensos, quando eu precisava me distrair do estresse você sempre me divertia, todos os desabafos e no final eu sempre ria de escutar você falar "qué desastre de verdad!". Obrigada por tudo Jime.

À Thais Almeida de Godoy e ao Luis Genda, meus pequenos preferidos. Sou muito grata por toda a ajuda que vocês me deram. Fotografar os meus ouricinhos na companhia de vocês era sempre mais divertido, saudades enormes de almoçar com vocês na floresta da Bio. Obrigada meus pequenos.

Ao Mario Costa Cruz, Especialista CONFOCAL. Por toda a ajuda que sempre esteve disposto a me ensinar usar equipamentos. Sou muito grata!

À Gisela Ramos, técnica de laboratório. Por ter feito todo o processo do meu material para microscopia eletrônica de transmissão.

Ao CEBIMar, por ser o melhor lugar que eu poderia querer para realizar os meus experimentos! E também ao Emerson e ao Alex que sempre me ajudaram com a logística e laboratório quando estive lá.

À FAPESP e CAPES, por terem acreditado no meu projeto, e proporcionado suporte a mim e ao laboratório do qual faço parte (processos nº 2017/25568-0 e 2018/14086-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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

RESUMO

Nanopartículas (NPs) constituem uma fonte de poluição ambiental difusa e de difícil remediação, tornando-se um grande e crescente problema ambiental. Dentre as nanopartículas, as de dióxido de titânio (nano-TiO_2) são de amplo uso e estão presentes em inúmeros produtos de consumo humano, sendo facilmente inseridas de maneira passiva em ecossistemas marinhos, especialmente em águas costeiras, onde estão menos difusas e em maiores concentrações (<1 mg/L), representando grande risco aos organismos ali presentes. Os ouriços-do-mar são considerados excelentes bioindicadores para avaliar possíveis estressores ambientais físico-quimicos, como mudanças climáticas e compostos tóxicos, principalmente durante o seu desenvolvimento embrionário. A exposição às NPs nos estágios iniciais de vida pode implicar, principalmente, no desenvolvimento incorreto, podendo, por sua vez, comprometer o estabelecimento dessas espécies. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da nano-TiO_2 (0,005, 0,05, 0,5 e 5 µg/mL) na fertilização e no desenvolvimento embrionário e larval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Para tanto, a toxicidade da nano-TiO_2 foi verificada por meio de testes de capacidade de fertilização e toxicidade ao longo do desenvolvimento, levando em consideração, alterações nas taxas de fertilização, parâmetros morfológicos (microscopia eletrônica de transmissão - MET), morfométricos e presença de malformações (microscopia convencional). Os resultados demonstraram que a exposição dos espermatozoides à nano-TiO_2 por 1 h induziu a diminuição na taxa de fertilização apenas na maior concentração (5 µg/mL). Durante o desenvolvimento das gástrulas, a nano-TiO_2 induziu maior toxicidade na concentração 0,005 µg/mL, com aumento do número de embriões com desenvolvimento interrompido, sendo esta, a concentração mais baixa testada e a que já se encontra presente no ambiente atualmente. No desenvolvimento das larvas, a maior concentração foi a única capaz de induzir alterações significativas com aumento do número de larvas com desenvolvimento interrompido (EC_{50} > 5 µg/mL). As mensurações realizadas demonstraram que a nano-TiO_2 induziu uma diminuição significativa no tamanho dos braços pós-oral de larvas plúteos, principalmente nas maiores concentrações (0,5 e 5 µg/mL). A partir da análise de MET foi possível observar aglomerados da nano-TiO_2 ao redor das larvas. Levando em consideração que as larvas são filtradoras, estas poderiam interagir com maior facilidade com as NPs em forma de agregados, resultando em um maior impacto no desenvolvimento mais tardio. Nossos resultados apontaram o potencial de toxicidade da nano-TiO_2, demonstrando seus efeitos

deletérios na taxa de fertilização e causando malformações e atrasos no desenvolvimento dos embriões e larvas de *L. variegatus*, em faixa de concentrações que vão desde cenários de exposição ambientalmente relevantes até de exposição aguda.

Palavras-chave: Nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO_2); Embrião; Desenvolvimento; *Lytechinus variegatus.*

Aluna: Letícia Palmeira Pinto

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

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are a major and growing environmental concerns for coastal marine environments. Among them, titanium dioxide (nano-TiO_2) are widely present in numerous products for everyday use as well as for human consumption, and can be occur at higher concentrations in marine coastal waters (<1mg/L), where they represent a risk to the organisms. Sea urchins are considered excellent bioindicators of environmental and anthropogenic stressors, such as climate change and marine pollutants, respectively, especially during their embryonic development. Exposure to NPs in the early life stages mainly implies larval malformations and developmental arrest, which may compromise the recruitment of these species. The present study aimed to evaluate the effects of nano-TiO_2 (0.005, 0.05, 0.5 and 5 μg/mL) on the fertilization, embryonic and larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. The toxicity of nano-TiO_2 was evaluated through fertilization capacity and development toxicity tests, taking into account changes in fertilization and developmental rates, morphological (investigated by TEM - transmission electron microscopy), morphometric parameters and presence of malformations (conventional microscopy). A decrease in fertilization rate was observed only at the highest concentration (5 μg/mL). During the development of the gastrulae, nano-TiO_2 induced higher toxicity at the low environmentally relevant concentration of 0.005 μg/mL, with a large number of embryos with arrested development. In the development of larvae, the highest concentration was more toxic, with a large number of arrested development larvae (EC_{50} > 5 μg/mL). The measurements showed that nano-TiO_2 induced a decrease in the size of the post-oral arms of the larva pluteus, especially at the highest concentrations (0.5 and 5 μg/mL). Large nano-TiO_2 agglomerates were observed around the larvae body. Taking into account that larvae are filter-feeding organisms, they could interact more easily with agglomerate-shaped NPs, resulting in a greater impact on development and growth. In conclusion, we showed the toxicity potential of nano-TiO_2 to the tropical sea urchin *L. variegatus*, with deleterious effects on fertilization rate and malformations and delays in the development of embryos and larvae, in concentrations ranging from environmentally- relevant to acute exposure scenarions.

Keywords: Titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO_2); Embryo; Development; *Lytechinus variegatus*.

Student: Letícia Palmeira Pinto

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- O número de moléculas de superfície (%) é inversamente relacionada com o tamanho das partículas (nm), aumentando exponencialmente quando o tamanho das partículas diminui < 100 nm.19

Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Interações da nano-TiO_2 em água Milli-Q. B e C: Nano-TiO_2 em água do mar natural com biomoléculas orgânicas levando a formação da eco-corona 23

Figura 3 - Ilustração da introdução ambiental da nano-TiO_2. A. Nano-TiO2 livres. B. Aglomerações das nano-TiO_2. C: Modificações da superfície da nano-TiO_2 após interação componentes orgânicos, íons outras substâncias suspensas na coluna d'água. D. Transferência de nano-TiO_2 para os organismos bentônicos através de fezes e pseudofezes. E e F. Perturbação superficial gerando ressuspensão de NPs precipitadas ocasionando reexposição. 25

Figura 4 - Fotomicrografia em campo escuro dos primeiros estágios do desenvolvimento do ouriço-do-mar Lytechinus variegatus. A: zigoto envolto com a membrana de fertilização. B: embrião em estágio de gástrula. C: larva plúteos. 28

Figura 5- Ilustração do desenvolvimento do embrião do ouriço-do-mar após a fertilização, passando pela fase embrionária e larval até a fase adulta. Vista lateral e vista de cima do desenvolvimento. 30

Figura 6- Mapa da localização da coleta dos espécimes de ouriço-do-mar verde L. variegatus. Ponto de coleta entre São Sebastião e Ilha Bela - SP (coordenadas 23°49'23.4"S 45°24'40.6"W). 33

Figura 7- Classificação de embriões e larvas segundo o critério de toxicidade aplicado após exposição às nano-TiO_2.....39

Figura 8- Parâmetros morfométricos analisados nas larvas de L. variegatus (24 hpf). Mensuração total do tamanho do corpo (TC), hastes somáticas (HS), braço pós-oral (PO), braço antero-lateral (AL) e largura da larva (LL) nas larvas de L. variegatus. 40

Figura 9- A: Distribuições de 3 medidas do tamanho da nano-TiO_2 (a 5 µg/mL) ponderadas por intensidade: comparação dos dados obtidos em análise DLS em água Milli-Q e NSW. Eixo-X mínimo em 10 nm (escala logarítmica); B: Aglomeração de nano-TiO_2 em NSW d dentro de 1 h a partir da preparação da suspensão. Análise DLS em intervalos de 7 min até 63 min.....43

Figura 10- Índice de fertilização após 1h de exposição dos espermatozoides de L. variegatus nas diferentes concentrações de nano-TiO_2. Os dados são expressos como Média ± SEM (n = 300). 44

Figura 11- Embriões de L. variegatus após exposição às nano-TiO_2. A: Porcentagem de embriões em estágio de gástrula bem desenvolvidas após exposição. B: Níveis representando grau de toxicidade de embriões expostas às nano-TiO_2. Dados apresentados em Média ± SEM (n= 300).....45

Figura 12- Fotomicrografia de contraste interferencial de fase de embriões em gastrula de L. *variegatus* 12 hpf. A: embrião em estágio de gástrula bem desenvolvida; B: gástrula inicial; C: gástrula aumentada; D: blástrula; E: embrião com malformação do arquêntero; F: exogastrulação; G: desenvolvimento interrompido. Microscopia de luz campo claro. Barra de escala: 50 µm. 45

Figura 13- Larvas plúteos bem desenvolvidas de L. variegatus após exposição às nano-TiO_2. A: Porcentagem de larvas bem desenvolvidas após exposição. B: Níveis representando grau de toxicidade de larvas expostas às nano-TiO_2. Dados apresentados em Média ± SEM (n=300).....46

Figura 14 - Fotomicrografia de contraste interferencial de fase de larvas plúteos de L. variegatus 24hpf. A: larva bem desenvolvida; B: larva aumentada; C: hastes separadas; D: larva com intestino invertido; E: plúteos jovem; F e G: desenvolvimento interrompido.....47

Figura 15- Mensuração de larvas plúteos de L. *variegatus* 24hpf após exposição a diferentes concentrações de nano-TiO_2. A: tamanho do corpo (TC); B: braço pós-oral (PO); C: hastes somáticas (HS); D: braço antero-lateral (AL); E: largura da larva (LL). Cada dado está expresso em Min - Max. (n ≅ 250).....49

Figura 16 - Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de embriões de embriões de L. *variegatus* em estágio de gástrula. Cortes ultrafinos. A: grupo controle; aumento de 550x; B: grupo exposto à concentração de 0,05 µg/mL de nano-TiO_2; aumento de 550x; C: grupo controle; aumento de 5000x; D: grupo exposto à concentração de 0,05 µg/mL de nano-TiO_2; aumento de 2100x. A seta azul indica o arquêntero formado; A seta amarela indica a camada de cílios da gástrula. Barra de escala: A = 10 µm; B =10 µm; C = 1 µm; D = 5 µm. 51

Figura 17- Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de *L. variegatus* em fase larval. Cortes ultrafinos. A: grupo controle de larva plúteos em 550x, pode-se observar o intestino da larva (seta azul); B: grupo exposto a concentração de 5 µg/mL de nano-TiO_2 em 1500x, possível agregação de nano-TiO_2 ao redor da larva (círculo vermelho); C: mesma foto do grupo controle com zoom de 2100x; D: grupo exposto a concentração de 5 µg/mL de nano-TiO_2 em 5000x, possível agregação de nano-TiO_2 ao redor da larva (círculo vermelho). Barra de escala: A = 10 µm; B = 5 µm; C = 5 µm; D = 1 µm. Seta amarela: camada de cílios da larva. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Disposição dos experimentos de capacidade de fertlização e embriotoxicidade. 36

Tabela 2- Resultados da análise DLS, mostrando Z-average (nm), índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ (mV). Os dados (± SD médios de 3 medidas) são referentes a uma concentração de nano-TiO_2 de 5 μg/mL. 42

Tabela 3- Toxicidade da nano-TiO_2 de acordo com o índice de toxicidade (IT) calculado de acordo com os níveis de malformações em embriões no estágio de gástrula e em larvas plúteos. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

NP	Nanopartícula
Nano-TiO_2	Nanopartículas de Dióxido de Titânio
MET	Microcopia Eletrônica de Transmissão
PS	Nanopartículas de Poliestireno
PS-NH_2	Nanopartículas de Poliestireno Catiônico
PS-COOH	Nanopartículas de Poliestireno Carboxil
UV	Raios Ultravioleta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ROS	Espécies de Oxigênio Altamente Reativas
CEBIMar	Centro de Biologia Marinha da USP
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
NSW	Água do Mar Natural
DSL	Dispersão de Luz Dinâmica
Z-average	Tamanho Médio Hidrodinâmico das Nanopartículas
PDI	Índice de Polidispersão
ζ-potencial	Potencial Zeta
ME	Mobilidade Eletroforética
Milli-Q®	Água Ultrapura
kHz	Hertz
$CuSO_4$	Sulfato de Cobre
LD50	Dose Letal Mediana
KCl	Cloreto de Potássio

IT	Índice de Toxicidade
ITI	Índice de Toxicidade Interativo
TC	Tamanho do Corpo da Larva
HS	Hastes Somáticas da Larva
PO	Braço Pós-oral da Larva
AL	Braço Antero-lateral da Larva
LL	Largura da larva
Nm	Nanômetro
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Nanopartículas 19
1.2 Poluição de nanopartículas 21
1.3 Nanopartícula de dióxido de titânio 22
1.4 Bioindicadores 24
1.5 Ouriço do mar como bioindicador 26
1.6 Fertilização, embrião e larva como bioindicadores 28
2 OBJETIVO GERAL 32
2.1 Objetivos específicos 32
3 MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 Coleta e manutenção dos ouriços-do-mar 33
3.2 Caracterização físico-química da nano-TiO_2 33
3.3 Preparação das suspensões de nano-TiO_2 34
3.4 Delineamento Experimental 35
3.5 Coleta dos gametas e teste de fertilização 36
3.6 Ensaio Embriotóxico de nano-TiO_2 37
3.7 Análise morfológica 38
3.8 Análise morfométrica de larvas 39
3.9 Analise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 40
3.10 Análise estatística 41
4 RESULTADOS 42
4.1 Caracterização físico-química da nano-TiO_2 42
4.2 Efeito da Nano-TiO_2 na Fertilização 43
4.3 Efeito Embriotóxico de nano-TiO_2 44
4.4 Índice de Toxicidade (IT) para Embriões e Larvas 47
4.5 Efeito do nano-TiO_2 na morfologia da larva 48
4.6 Efeito da nano-TiO_2 por MET 49
5 DISCUSSÃO 53
6 CONCLUSÃO 57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

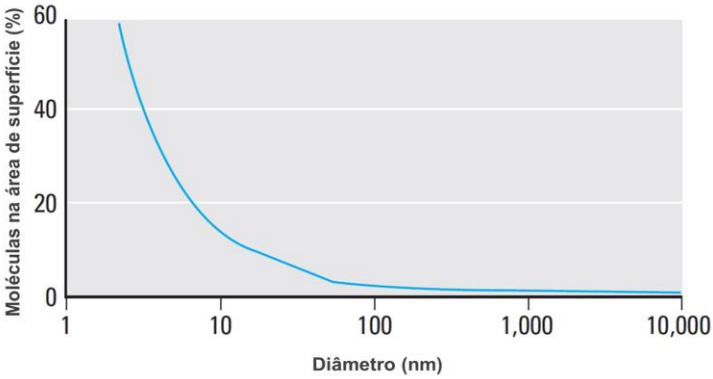
1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartículas

Com o avanço da tecnologia, novas demandas de materiais para uso humano estão surgindo, implicando consequentemente no aparecimento, com altas taxas de produção, de novas fontes antropogênicas de contaminação ambiental. A nanotecnologia, que está presente no cotidiano humano só há algumas décadas, utiliza nanomateriais ou nanopartículas (NPs), que são partículas caracterizadas por terem tamanhos entre 1 e 100 nm (MEARNS *et al.*, 2013; MARQUARDT *et al.*, 2017; OECD, 2009).

As NPs possuem propriedades físico-químicas que são atribuídas, principalmente, ao seu pequeno tamanho (área de superfície), composição química, formato, estrutura de superfície (carga superficial), e agregação. O tamanho de uma NP é de extrema importância, pois quanto menor a partícula, maior será a sua área de superfície, ou seja, os átomos ou moléculas da partícula estarão mais expostos na superfície dela do que em seu interior, permitindo assim uma maior interação com o meio externo. Essa relação inversa entre área de superfície-tamanho (Figura 1) é o que pode determinar a reatividade do material. As propriedades químicas e sua interação com os sistemas biológicos podem ocasionar atividade antioxidante, penetração de barreiras celulares, indução de estresse oxidativo ou de disfunção celular. (OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005; NEL *et al.*, 2006; GRAINGER; CASTNER, 2008).

Figura 1- O número de moléculas de superfície (%) é inversamente relacionada com o tamanho das partículas (nm), aumentando exponencialmente quando o tamanho das partículas diminui < 100 nm.



Adaptado de: OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005.

A mudança nas propriedades físico-químicas das NPs pode levar a possíveis efeitos toxicológicos e, quando as NPs estão em meio aquático, elas sofrem alterações influenciadas diretamente pelos parâmetros do meio. Tendo isso em mente, é de extrema importância definir os fatores ambientais relevantes que são capazes de afetar o comportamento e efeitos das NPs, alterando assim suas propriedades físico-químicas. (HAYNES *et al.*, 2017).

A nanotoxicologia em sistemas aquáticos é complexa, pois todos os parâmetros do meio, como: salinidade, pH e interação com matéria orgânica, afeta diretamente em seu comportamento (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; HOSHINO *et al.*, 2004).

Em meio aquático, as NPs tendem a agregar-se, e essa agregação depende de características superficiais da NP (carga superficial e tamanho) e do meio (pH da água e matéria orgânica). Em água salgada, por exemplo, devido à força iônica da água, a negatividade da carga de superfície das NPs diminui, o que aumenta a agregação. O aumento da agregação das NPs reduz sua área de superfície, o que, consequentemente, afeta sua dispersão na água. (JIANG; OBERDORSTER; BISWAS, 2009; BATLEY *et al.*, 2013; BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014).

Além das características citadas, as NPs possuem também característica de agregar/aglomerar. A agregação se dá quando NPs se ligam com NPs da mesma natureza (NP + NP), também denominado de homoagregação, são ligações fortes e densas. Já a aglomeração, acontece quando NPs se ligam com substâncias que estão em suspensão no mesmo meio em que estão dispersas, como componentes orgânicos, íons e talvez contaminantes químicos, formando aglomerados (NP + outros materiais e/ou outros tipos de NPs), também denominado de heteroagregação (ZARE *et al.*, 2016; PRAETORIUS *et al.*, 2020; CORSI; BERGAMI; GRASSI, 2020).

Desta forma, a aglomeração das NPs vai influenciar diretamente na sua biodisposição e toxicidade, uma vez que a heteroagregação facilita a incorporação de outros compostos que não são necessariamente NPs. Portanto, uma vez no ambiente, as NPs tendem a constituir uma fonte de poluição ambiental de difícil remediação (MEARNS *et al.*, 2013; MOTTIER *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2017).

1.2 Poluição de nanopartículas

O uso e prevalência das NPs vêm aumentando e, inevitavelmente, ocorre a dissipação destas em ambientes de água doce e marinhos. A poluição por NPs em ecossistemas marinhos ocorre através da disseminação direta (esgoto doméstico ou industrial) ou indireta (rios e estuários). As partículas que chegam ao mar podem diferir em tamanho e em propriedades físico-químicas, já que são disseminadas em sistemas dinâmicos, como o ecossistema marinho, que por sua vez, pode atuar como um potencial dissipador de nanomateriais (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; NOWACK; MITRANO, 2018; KLAINE *et al*., 2008).

As principais fontes de NPs que chegam nos ecossistemas marinhos, podem ser de origem primária, como: protetor solar (principalmente com o com alto consumo em áreas de grande turismo) e tintas anti-incrustantes/anticorrosivas presentes em cascos de navios, ou secundária: produtos de cuidados pessoais como cosméticos e pasta de dentes, e efluentes (MATRANGA; CORSI, 2012; MCCOSHUM; SCHLARB; BAUM, 2016).

As NPs têm uma alta reatividade superficial e, portanto, quando dispersas em ambientes de águas naturais interagem e rapidamente absorvem em sua superfície algumas biomoléculas orgânicas, formando uma camada de estruturas orgânicas, a Eco-corona. Essa camada reveste as NPs, o que pode mudar sua estabilidade, identidade e, finalmente toxicidade (LYNCH *et al*., 2014; NASSER; CONSTANTINOU; LYNCH, 2019).

As NPs de plástico de poliestireno (PS), por exemplo, sofrem agregação diferente em água do mar, dependendo se sua carga superficial é carregada positivamente ($PS\text{-}NH_2$) ou negativamente (PS-COOH), afetando assim, seu acúmulo, bio-distribuição e toxicidade nos organismos, sendo que as com cargas positivas tendem a serem mais tóxicas (DELLA TORRE *et al.*, 2014). Entretanto, as NPs metálicas passam por interações/transformações complexas na água do mar. Devido à sua composição química e alta probabilidade de agregação, o que resulta na sedimentação, corrosão e biodisponibilidade, consequentemente podem ser altamente tóxicas para o ecossistema marinho (CORSI *et al*., 2014).

As NPs são bem conhecidas por afetarem organismos marinhos, causando uma grande variedade de lesões. A absorção ou ingestão de NPs, resulta em seu acúmulo em células e tecidos, causando efeitos deletérios em diferentes organismos, como peixes (*Dicentrarchus labrax*), ouriços-do-mar (*Strongylocentrotus droebachiensis*), moluscos (*Mytilus galloprovincialis*),

crustáceos (*Artemia franciscana*), microalgas (*Dunaliella tertiolecta* que por sua vez, podem ser transferidas, via cadeia trófica, de um organismo para o outro ou até a morte dos mesmos (PICCHIETTI *et al.*, 2017; MAGESKY; PELLETIER, 2015; CANESI; CORSI, 2016; LIBERATO *et al.*, 2013; BERGAMI *et al.*, 2017).

1.3 Nanopartícula de dióxido de titânio

Entre as diferentes NPs, as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO_2) se destacam por ser um dos óxidos de metais mais fabricados, possuem alto rendimento e alta demanda em todo o mundo, estimando-se que em 2025 a produção venha a atingir 2,5 milhões de toneladas por ano (NOWACK; BUCHELI *et al*., 2007; ROBICHAUL *et al*., 2009). Estas são amplamente encontradas em vários produtos comerciais devido ao seu brilho, propriedade de branqueamento, resistência aos raios ultravioleta (UV) e alto índice de refração (VANCE *et al*., 2015).

As nano-TiO_2 apresentam propriedades físico-químicas particulares, tais como atividade fotocatalítica, fotoelétricas (permitem conversão de energia solar), anticorrosiva e alta estabilidade (CARP; HUISMAN; RELLER, 2004).

Devido a todas as suas propriedades, as nano-TiO_2 podem ser encontradas em inúmeros produtos de consumo humano, como fármacos, produtos de cuidado pessoal (*skincare*), protetores solares, corantes de alimentos, cremes dentais, tintas, entre outros. (MATRANGA; CORSI 2012; XIONG *et al*., 2011; WEIR *et al*., 2012). O alto consumo de produtos com nano-TiO_2, e a degradação que ocorre pós o uso destes, estão aumentando as concentrações ambientais de nano-TiO_2 nas águas de superfície dos ambientes aquáticos, gerando uma preocupação eminente (SUN *et al*., 2014)

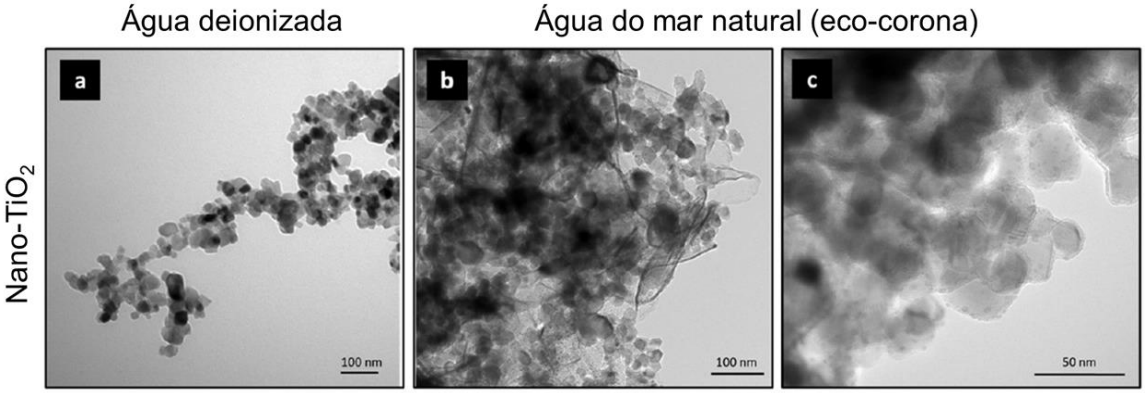
Por apresentarem propriedades fotocatalíticas, as nano-TiO_2 são utilizadas, ainda, para tratamento de esgoto, pois na presença de luz UV, tais NPs são capazes de danificar as membranas celulares e o DNA de bactérias presentes nas águas residuais; fato, este, que ocorre, devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) alterações que ocorrem na estrutura da nano-TiO_2 que faz com que elas reajam e formem espécies de oxigênio altamente reativas (ROS) (MILLER *et al*., 2012). Contudo, essa mesma reação fotocatalítica, na presença de luz UV, pode potencializar fortemente a toxicidade da nano-TiO_2 (JOHNSON *et al*., 2015).

Em decorrência da ampla utilização, as nano-TiO_2 podem ser inseridas em ecossistemas marinhos diretamente ou indiretamente, através de efluentes de águas residuais, atividades na praia, entretanto, o acúmulo no ambiente é mais alto próximo da costa, principalmente em época de maior turismo (XIONG *et al*., 2011; BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; HAYNES; WARD, 2020). Recentemente, pesquisadores mostraram que no verão, altas concentrações de nano-TiO_2 podem ocorrer em águas costeiras, podendo exceder de 900 $\mu g\ L^{-1}$ na água superficial perto de praias populares na costa Mediterrânea (LABILLE *et al*., 2020), o que pode causar níveis consideráveis de exposição aos organismos marinhos, além de possibilitar a transferência trófica (HOU; WESTERHOFF; POSNER, 2013).

Devido a sua alta reatividade superficial e carga negativa, as nano-TiO_2 tem tendência a adsorver metais e interagir com diferentes substâncias orgânicas dissolvidas, particuladas e coloidais, o que aumentam o potencial da nano-TiO_2 para aglomeração e pode influenciar diretamente na sua toxicidade (TAN; FAN; WANG, 2012; NAASZ; ALTENBURGER; KÜHNEL, 2018; DOYLE *et al*., 2014).

Corsi, Bergami e Grassi (2020) demonstraram o comportamento de homoagregados de nano-TiO_2 em água deionizada (Figura 2.A), e a formação da eco-corona na nano-TiO_2 em água do mar natural (Figura 2.B e C).

Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão (MET). A: Interações da nano-TiO_2 em água Milli-Q. B e C: Nano-TiO_2 em água do mar natural com biomoléculas orgânicas levando a formação da eco-corona



Adaptado de: CORSI; BERGAMI; GRASSI, 2020.

Diferentes estudos têm relatado os potenciais efeitos tóxicos das nano-TiO_2 com organismos de diferentes espécies e ambientes do mundo. Por exemplo, estudos realizados por Miller *et al*. (2012) relataram sobre o efeito fototóxico das nano-TiO_2 após exposição de quatro espécies diferentes de fitoplânctons à luz solar. Barmo *et al*. (2013) mostraram que as nano-TiO_2, mesmo em concentrações próximas aos níveis ambientais, foi nociva para o sistema imune e glândula digestiva de bivalves marinhos *Mytilus galloprovincialis*. Jovanovic e Guzmán (2014), sugeriram que possivelmente a nano-TiO_2 contribui para uma diminuição geral nas populações dos corais, pois a exposição induziu estresse gênico e bioacumulação em recifes de coral do Caribe *Montastraea faveolata*, e também causaram o afastamento de Zooxantela (organismos fotossintéticos que vivem em endossimbiose com os corais). Marisa *et al*. (2018) demonstraram que bivalves marinhos japoneses *Ruditapes philippinarum* expostos à nano-TiO_2 apresentaram alterações tanto ao nível bioquímico quanto o celular, além de apresentar acumulação nas brânquias e na glândula digestiva.

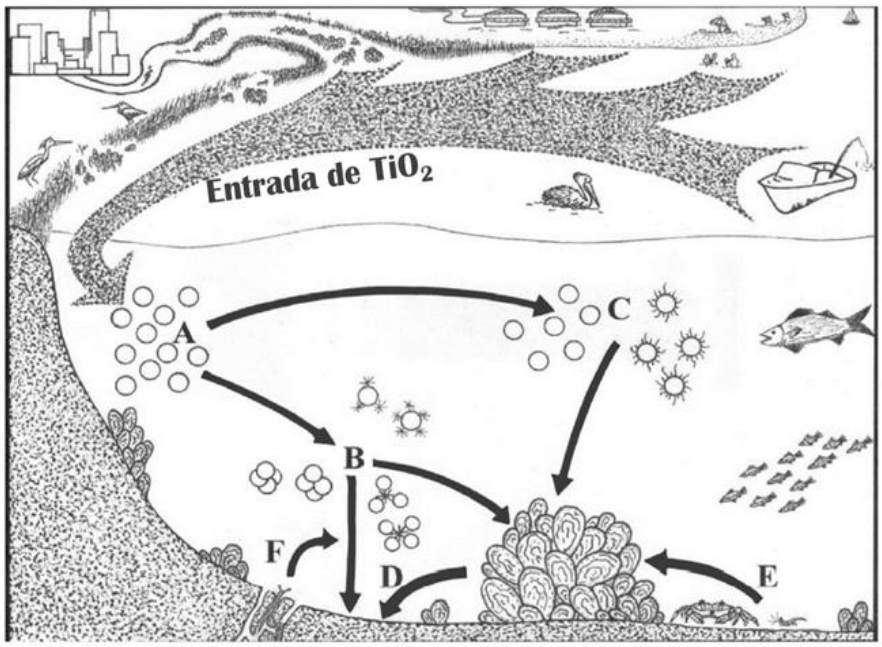
O efeito das nano-TiO_2 também tem sido estudo em outros modelos biológicos, como no desenvolvimento embrionário de ratos (HONG *et al*., 2017), cultura de células do epitélio intestinal (PEDATA *et al*., 2019), e na expressão de microRNA de plantas (Boykov*;* Shuford; Zhang, 2019). Que evidencia esta problemática como uma preocupação de grupos de pesquisa de diferentes áreas.

Considerando estes estudos, percebe-se que o impacto biológico das nano-TiO_2 constitui uma questão importante por sua complexa ecotoxicidade, sendo importante compreender a interação destas em diferentes organismos e ambientes.

1.4 Bioindicadores

Organismos marinhos de diferentes níveis tróficos podem ser afetados pelas NPs (MATRANGA; CORSI, 2012), como os fitoplâncton e zooplâncton, que vivem na coluna d'agua, podem estar expostos às NPs suspensas, por ação de turbulência no oceano e efeitos das ondas, por exemplo; e animais bentônicos, já que quando as NPs agregadas/aglomeradas são facilmente sedimentadas, podem ter impactos sub-letais em espécies detritívoras (TIAN *et al*., 2014; KLAINE *et al*., 2008; STOLPE; HASSELLOV, 2007). Johnson *et al*. (2015) ilustraram as interações que podem ocorrer com os organismos marinhos com a entrada da nano-TiO_2 no ecossistema marinho (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração da introdução ambiental da nano-TiO_2. A. Nano-TiO2 livres. B. Aglomerações das nano-TiO_2. C: Modificações da superfície da nano-TiO_2 após interação componentes orgânicos, íons outras substâncias suspensas na coluna d'água. D. Transferência de nano-TiO_2 para os organismos bentônicos através de fezes e pseudofezes. E e F. Perturbação superficial gerando ressuspensão de NPs precipitadas ocasionando reexposição.



Adaptado de: (JOHNSON *et al.*, 2015).

Os principais alvos biológicos no ambiente marinho são: a) os organismos que vivem na zona pelágica (coluna d'água), que vão desde o fitoplânctons aos mamíferos marinhos e também os peixes de mar profundo, que estão suscetíveis à NPs aglomeradas em suspensão; b) os organismos filtradores, que podem ser expostos também aos aglomerados em suspensão; c) os organismos bentônicos que vivem no sedimento e, consequentemente, são expostos às NPs já precipitadas e depositadas no fundo (MATRANGA; CORSI, 2012).

Consequentemente, espécies filtradoras, por exemplo, podem absorver as NPs pelas brânquias, causando lesões e prejudicando o correto funcionamento destes órgãos, além de acúmularem em outros tecidos (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014). Ademais, pode ocorrer transferência trófica e possível bioacumulação e biomagnificação destas para outros organismos, por predação ou por excretas dos organismos, como por exemplo os bivalves marinhos, que são filtradores e podem ter sido expostos às NPs durante a alimentação, consequentemente, suas excretas podem estar carregadas de NPs, o que provavelmente serão incorporados no sedimento, e

eventualmente estarão biodisponíveis para diversos animais bentônicos (CONWAY *et al*., 2014; TIAN *et al*., 2015).

A transferência trófica de NPs pode ocasionar problemas nos sistemas bióticos, assim como nos de saúde pública, uma vez que espécies consumidas pelo homem podem estar contaminadas (MINETTO; LIBRALATO; VOLPI GHIRARDINI, 2014; BLASCO *et al*., 2015; MOORE, 2006).

Sendo assim, o monitoramento é feito utilizando espécies bioindicadoras, que são caracterizadas por evidenciarem aspectos do ambiente em que vivem, por meio de alterações em diversos níveis, desde modulações moleculares a alterações histológicas e mesmo comportamentais. (MOORE, 2006; MATRANGA; CORSI, 2012; NANDAN; NIMILA 2012).

Alguns invertebrados marinhos possuem um grande potencial para atuarem como bioindicadores à exposição de NPs, já que são alvos diretos, sendo expostos tanto em estágio embrionário e larval, quando são importantes componentes do zooplacton e nadam na coluna d'água até a sua metamorfose, consequentemente susceptíveis à ação de NP em suspensão, como em estágio adulto, pela presença de frações de NPs no sedimento. (CANESI; CORSI, 2016; MATRANGA; CORSI, 2012; MANZO *et al*., 2013).

A compreensão da complexa interação entre bioindicadores-NPs-biomoléculas suspensas em ambiente aquático se faz necessária para compreender a ecotoxicidade das NPs e seu impacto ambiental. Para tanto, é utilizado organismos modelos, como por exemplo o ouriço do mar, que possuem o potencial de transparecer os possíveis resultados nocivos para organismos mais complexos (CORSI; BERGAMI; GRASSI, 2020).

1.5 Ouriço do mar como bioindicador

Os ouriços-do-mar são invertebrados marinhos deuterostômios, pertencentes ao Filo Equinodermata da classe Echinoidea. São organismos exclusivamente marinhos, tipicamente bentônicos, com baixa capacidade de locomoção, sem dimorfismo sexual e detritívoros. São caracterizados como celomados, com simetria bilateral na fase larval, e pentaradial na fase adulta. Possuem endoesqueleto, composto por ossículos calcários, formando uma superfície esquelética, a carapaça de carbonato de cálcio, onde encontram-se os espinhos, e que delimita a cavidade celomática, preenchida por líquido celomático. Na cavidade celomática, encontram-se as gônadas, o aparelho digestório e os cordões nervosos que fazem parte do sistema nervoso simples por eles

apresentados. As brânquias ficam externas à carapaça, rodeando a extremidade da membrana peristomial (membrana ligeiramente calcificada ao redor da boca), que delimita os cinco dentes da lanterna de Aristóteles, órgão utilizado para alimentação (HYMAN, 1955; RUPPERT; BARNES, 1996).

Os ouriços-do-mar possuem grande importância nas comunidades bentônicas. São espécies de sobrevivência bem-sucedidas, amplamente distribuídos em diversas latitudes e temperaturas, podendo ser encontrados em zonas polares e tropicais, e são considerados espécie modelo no ambiente costeiro, pois habitam desde a zona infralitoral até profundidades de mais de 20 metros (RAST *et al*., 2006; PEARSE, 2006; MATRANGA *et al*., 2011; GIANGUZZA *et al*., 2006).

Desde o final do século XIX, os ouriços-do-mar vem sendo estudados como excelente modelo para a embriologia clássica e biologia celular (GIUDICE, 1986; MATRANGA, 2005). Além de compartilharem muitas semelhanças metabólicas e fisiológicas com mamíferos, sua relação genética é muito semelhante ao genoma humano, tendo estimados 23.300 genes (muitos do que se acreditavam serem inovações de vertebrados) (HAYDEN, 2010; SEA URCHIN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006).

Vários aspectos tornam o ouriço-do-mar um excelente bioindicador marinho para avaliar a toxicidade de diferentes compostos químicos e estressores ambientais, tanto na fase adulta na avaliação do sistema imunológico inato, quanto durante o desenvolvimento embrionário e larval, uma vez que sua transparência permite analises dos efeitos morfológicos causados por agentes estressores (MATRANGA *et al*., 2011; MORRONI *et al*., 2016).

Alguns trabalhos criaram métodos para avaliar a toxicidade (IT- índice de toxicidade) de contaminantes utilizando o desenvolvimento do ouriço-do-mar como bioindicador. Carballeira *et al.*, (2012) desenvolveram o primeiro IT, visando identificar e categorizar de maneira mais eficaz malformações nas larvas. Outros pesquisadores aperfeiçoaram esta abordagem sugerindo o ITI (índice de toxicidade interativo) para calcular a frequência e a gravidade de malformações, e posteriormente apontaram que a utilização de 4 diferentes ITIs seria um método mais sensível, avaliando embriões e larvas (MORRONI, *et al.*, 2016; BONAVENTURA, *et al.*, 2021).

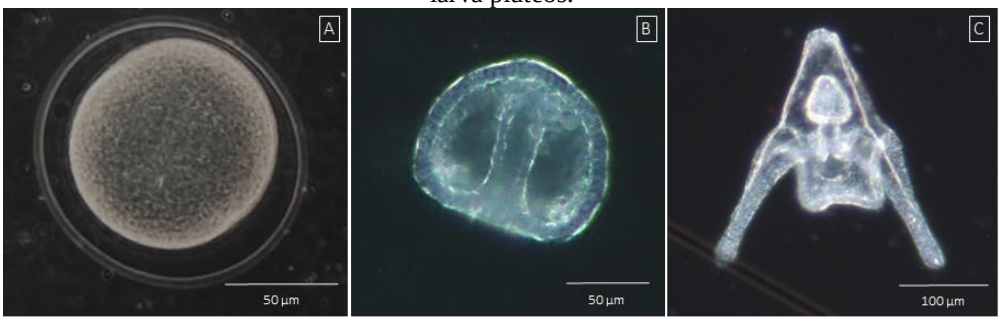
Os ouriços-do-mar possuem mecanismos moleculares que vão atuar de maneira basal para o correto desenvolvimento e formação do embrião, entretanto, a ativação excessiva destes em função de diversos estressores gera um alto custo energético, que por sua vez, poderá afetar o desenvolvimento embrionário e contribuir para o surgimento de malformações

(BONAVENTURA; MATRANGA, 2017). Portanto, nem sempre esses mecanismos de defesa são capazes de reconhecer e neutralizar os contaminantes, sendo que a presença de contaminantes, como NPs, durante o desenvolvimento de ouriços-do-mar podem comprometer não apenas o seu desenvolvimento, mas também o sucesso da reprodução (GALLO *et al*., 2018; MESARIC *et al*., 2015; MAISANO *et al*., 2015).

1.6 Fertilização, embrião e larva como bioindicadores

A fecundação do ouriço-do-mar ocorre externamente, onde, após a liberação dos gametas masculino e feminino, vários milhões de ovos são fertilizados e se desenvolvem de forma sincronizada. O envelope de fertilização do óvulo recém-fertilizado (zigoto) é transparente (Figura 4.A), assim como os embriões e larvas (Figura 4.B e C), permitindo a fácil observação das células e tecidos ao longo do seu desenvolvimento (GAMBARDELLA *et al*., 2016).

Figura 4- Fotomicrografia em campo escuro dos primeiros estágios do desenvolvimento do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. A: zigoto envolto com a membrana de fertilização. B: embrião em estágio de gástrula. C: larva plúteos.



Fonte: arquivo pessoal.

A fertilização externa dos ouriços-do-mar ocorre devido a uma rede complexa de interações recíprocas entre ovos e espermatozoides. Assim que os ovos saem dos gonóporos (canal de liberação dos gametas) eles passam a liberar moléculas espécie-específicas que atraem espermatozoides para a possível interação. Por outro lado, os espermatozoides, quando são liberados pelos gonóporos, ainda não estão ativos, só após entrarem em contato com a água do mar que acontece sua ativação, o tornando capaz de nadar e posteriormente ser atraído pelo óvulo onde ocorre o reconhecimento espécie-específica. A reação acrossômica é iniciada no contato do espermatozoide com a camada gelatinosa do óvulo, o que resulta na exocitose da vesícula

acrossomal do espermatozoide e na liberação das hidrolases que irão digerir a camada gelatinosa e permitir, na sequência, o contato e reconhecimento entre os gametas e a fusão dos mesmos, levando à elevação do envelope de fertilização que é mediado pelo aumento da concentração intracelular do cálcio. (DAN, 1967; FRANKLIN 1970; LEVINE; WALSH; FODOR 1978).

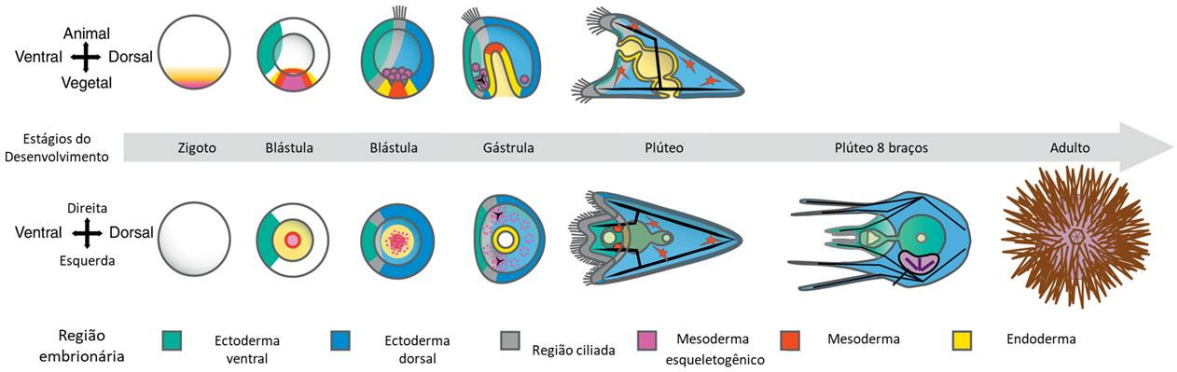
Ensaios com espermatozoides, embriões e larvas de ouriço-do-mar tem sido utilizados para testes de toxicidades desde a década de 1980 por uma série de pesquisadores, visando o estudo de águas marinhas costeiras (DINNEL; LINK; STOBER, 1987; DINNEL *et al*., 1989).

Realizar ensaios sobre a fertilização e o desenvolvimento traz a perspectiva de comparar os efeitos da mesma substância em dois sistemas biológicos diferentes: espermatozoides e embriões. Os espermatozoides são células únicas, altamente especializadas e, quando interagem com substâncias tóxicas, podem apresentar danos transmissíveis à prole que irá se desenvolver, ou uma redução na capacidade de fertilização devido a uma diminuição da motilidade, ou até mesmo supressão da capacidade de fertilização (MANZO *et al*., 2013).

Após a fertilização, o embrião sofre as primeiras divisões, estágio de mórula e blástula. A polaridade dorsal/ventral só se torna morfologicamente aparente na gástrula inicial (Figura 5). Conforme a gástrula se forma, ocorre o achatamento do polo vegetal do embrião, o arquêntero se curva em direção a ectoderme do polo animal e acontece a migração e o posicionamento assimétrico das células mesenquimais esqueléticas (que darão origem às espículas). A polaridade doral/ventral é ainda mais acentuada no primeiro estágio larval, quando os quatro braços da larva crescem no lado ventral enquanto a boca se forma sobre o ectoderma ventral e a larva se alonga ao longo do lado dorsal para se tornar a larva plúteos (LAPRAZ; BESNARDEAU; LEPAGE, 2009).

Na fase plúteos, a ectoderme ventral e dorsal da larva fica separada por uma faixa de células cuboidais ciliares (Figura 5) (LAPRAZ; BESNARDEAU; LEPAGE, 2009). A formação das espículas se dá pelas células mesenquimais esqueléticas sendo um evento significativo na embriogênese do ouriço-do-mar e essencial para a sobrevivência e continuidade do desenvolvimento larval (DECKER; LENNARZ, 1988).

Figura 5- Ilustração do desenvolvimento do embrião do ouriço-do-mar após a fertilização, passando pela fase embrionária e larval até a fase adulta. Vista lateral e vista de cima do desenvolvimento.



Adaptado de: LAPRAZ; BESNARDEAU; LEPAGE (2009)

Diversos aspectos justificam o interesse do ponto de vista ecotoxicológico na utilização de embriões de ouriço-do-mar como modelo bioindicador, visto que os ensaios podem ser realizados em um curto período de tempo (24, 48 e 72 h), e os efeitos sobre o desenvolvimento podem ser monitorados a nível morfológico e molecular (MATRANGA; CORSI 2012; MANZO, 2004).

Uma vez presente no ambiente, os diferentes estressores, como as NPs, podem atuar nos gametas e no início da embriogênese do ouriço-do-mar, pois estes não apresentam tantas estruturas protetoras. Diferente de espécimes adultos, que são relativamente mais resistentes à contaminantes, sendo os espermatozoides e os estágios embrionário e larval são diretamente afetados pela presença de contaminantes. Consequentemente estes estágios iniciais podem ser mais sensíveis à presença de NPs, especialmente em águas costeiras, onde as NPs são menos difusas e estão em maior concentração, podendo induzir respostas dos organismos aos efeitos deletérios de contaminantes e que podem ser utilizadas como bioindicadores ambientais (GAMBARDELLA *et al*., 2016; MESARIC *et al*., 2015; BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014).

Estudos realizados com diversos tipos de NPs demonstraram os efeitos deletérios no desenvolvimento de ouriços-do-mar, como NPs plásticas (DELLA TORRE *et al*., 2014; PINSINO *et al*., 2017), de prata e carbono (MANNO, *et al*., 2013), de ouro e dióxido de titânio (PIKULA *et al.*, 2020), e também efeitos sobre os espermatozoides como NPs de óxido de cobre (MAISANO *et al*. 2015), de cobalto e dióxido de titânio (GAMBARDELLA, *et al*., 2015), e de óxido de zinco (MANZO, *et al*., 2013). Desta forma, este quadro nos mostra o potencial impacto destes nanomateriais para classe Echinoidea em diferentes ambientes, no entanto ainda pouco se sabe do comportamento e toxicidades de NPs em ambiente e organismos tropicais. Levando em

consideração que a nano-TiO_2 é a nanopartícula de maior produção antrópica (ROBICHAUL *et al*., 2009), e que seu descarte no ambiente ainda é imensurável, é inevitável a preocupação com os possíveis impactos dessa ameaça ao ambiente marinho, principalmente os organismos que vivem em regiões costeiras.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO_2) (0,005, 0,05, 0,5 e 5 µg/mL) na fertilização e no desenvolvimento embrionário (12h) e larval (24h) do ouriço-do-mar tropical, *Lytechinus variegatus.*

2.1 Objetivos específicos

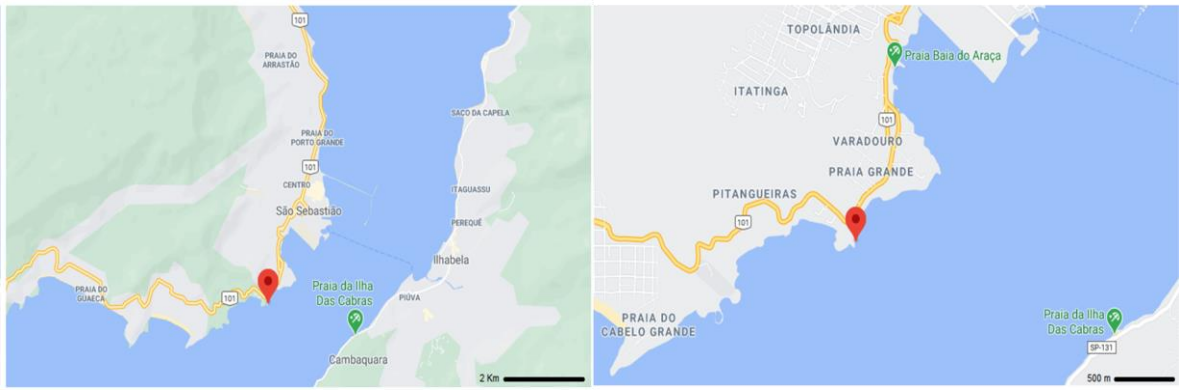
- Caracterização da nano-TiO_2 na água do mar;
- Avaliação do efeito da nano-TiO_2 sobre a fertilização;
- Avaliação da toxicidade da nano-TiO_2 no desenvolvimento ≅12 e 24h pós fertilização;
- Avaliação da morfologia e ultraestrutura de embriões e larvas após exposição a nano-TiO_2;
- Avaliação morfométrica larval após exposição a nano-TiO_2;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção dos ouriços-do-mar

Adultos sexualmente maduros de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* foram coletados manualmente, por mergulho livre, nos arredores do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar-USP) São Sebastião - Litoral norte do Estado de São Paulo (Figura 6), a uma profundidade de 2 a 5 m, temperatura da água de superfície: 25ºC ± 2, salinidade: 35, pH: 7,8 ± 0,2. Os animais foram mantidos em tanques de 500 L, com água do mar corrente até o momento da realização dos ensaios, por um período de aclimatação de 2 dias. A coleta teve a autorização concedida pelo ICMBio (nº 61056).

Figura 6- Mapa da localização da coleta dos espécimes de ouriço-do-mar verde L. variegatus. Ponto de coleta entre São Sebastião e Ilha Bela - SP (coordenadas 23°49'23.4"S 45°24'40.6"W).



Fonte: Google mapas

3.2 Caracterização físico-química da nano-TiO_2

As nano-TiO_2 (Aeroxide©, 99,9% - Eigenmann & Veronelli), com diâmetro médio de 24 ± 7 nm, foram fornecidas pela Profa. Dra. Ilaria Corsi (Universidade de Siena, Itália). Inicialmente foi preparada uma suspensão estoque de nano-TiO_2 (10 mg mL^{-1}) em água Milli-Q e submetidas à sonicação (100 W por 45 min em banho de gelo) (DELLA TORRE *et al*.,2015). As suspensões finais foram preparadas em água do mar filtrada a 0,22 µm (NSW - 25ºC ± 2, salinidade: 35, pH: 7.8 ± 0.2), coletadas no mesmo local de amostragem dos ouriços do mar.

Por meio da técnica de DSL (Dispersão de Luz Dinâmica), foram determinados os parâmetros relacionados ao tamanho das nano-TiO_2, o tamanho médio hidrodinâmico das nanopartículas (Z-average, nm) e o índice de polidispersão (PDI, adimensional). O valor de PDI mostra quanto a suspensão está dispersa, quando o valor de PDI for = ou > que 0,3, significa que as agregações de nanopartículas podem ser maiores do que o tamanho apresentado pela maioria no Z-average. A mensuração desses parâmetros permite descrever o comportamento das NPs quando dispersas em meio aquoso (STONE *et al*., 2010; MOURDIKOUDIS; PALLARES; THANH, 2018).

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

Para estas análises, as suspensões de nano-TiO_2 a 5 mg mL^{-1} foram preparadas em água Milli-Q® (meio de referência para dispersão ideal, pois as nanopartículas não interagem com nenhuma outra substância iônica, servindo de controle) e em NSW (água do mar natural, do inglês "*natural seawater*", meio de exposição utilizado nos experimentos de exposição). Após o preparo, as nano-TiO_2 foram submetidas rapidamente à homogeneização em agitador do tipo Vórtex. As medições (n = 3 para cada condição) foram realizadas a 25°C logo após a preparação das suspensões das nano-TiO_2, cada uma correspondendo a 11 corridas de 10 s para análise de DLS e 20 corridas para ME.

Para acompanhar as mudanças dinâmicas da nano-TiO_2 sob as condições experimentais (25°C, no escuro), análises do comportamento hidrodinâmico foram realizadas em DLS, em intervalos de 7 minutos, até 63 minutos após a dispersão em NSW.

3.3 Preparação das suspensões de nano-TiO_2

As soluções de nano-TiO_2 foram preparadas imediatamente antes dos períodos de exposição, seguindo o protocolo proposto por Pinsino e *et al.*, (2015) com algumas modificações. Inicialmente, uma suspensão estoque de nano-TiO_2 (1 mg/mL) foi preparada em água Milli-Q®, e submetida a um sonicador em banho de água fria (frequência 42 kHz) por 2 h. Após este período, foram preparadas as suspensões intermediárias, diluídas em NSW e coletada no mesmo ponto de coleta dos ouriços. As suspensões intermediárias também foram submetidas à sonicação em água

fria por 45 min. Adicionalmente, todas as suspensões foram submetidas à homogeneização, em agitador do tipo Vortex, imediatamente antes do uso e por fim adicionadas às placas nas concentrações finais desejadas.

3.4 Delineamento Experimental

Para realização deste trabalho, os experimentos foram divididos em 3 partes para avaliar diferentes aspectos da toxicidade das nano-TiO_2 (Tabela 1).

Para os experimentos de capacidade de fertilização, suspensões de gametas masculinos em NSW foram expostas em microtubos, durante 1 h, às diferentes concentrações de nano-TiO_2 (0,005, 0,05, 0,5 e 5 µg/mL) e, posteriormente adicionadas às placas de cultura de 24 poços contendo a quantidade de óvulos estipulados. O grupo controle foi incubado em NSW, e posteriormente, adicionados à placa contendo os óvulos para fertilização. Os gametas e zigotos foram fixados 10 min após a adição dos espermatozoides. O ensaio foi considerado viável quando o indicie de fertilização do controle foi ≥ 90%. Todos os experimentos foram realizados com 3 réplicas.

Para os experimentos de embriotoxicidade, os embriões foram cultivados em placas de cultura de 24 poços e divididos em dois grupos: embriões em gástrula, estágio observado ≅12h pós-fertilização (12 hpf) e larva plúteos, estágio obtido ≅24h pós-fertilização (24 hpf); e expostos às quatro diferentes concentrações de nano-TiO_2: 0,005, 0,05, 0,5 e 5 µg/mL. As concentrações utilizadas foram baseadas no trabalho de Bourgeault *et al*. (2015), para a concentração ambiental (0,005 µg/mL), e de Canesi *et al*. (2010) para a concentração mais alta (5 µg/mL). Além disso, foram adicionadas duas concentrações intermediárias na mesma ordem de grandeza. Para o grupo controle foi utilizado NSW. Todos os experimentos foram realizados com 3 réplicas.

Para determinar o controle positivo foi utilizado um tóxico de referência, o sulfato de cobre ($CuSO_4$) (MANZO, *et al.*, 2004), e foi calculada uma curva de dose resposta (EC_{50}) com as concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL. A curva determinou que a concentração EC_{50} de $CuSO_4$ para o *L. variegatus* é 1,24 µg/mL, e o cálculo da EC_{50} foi realizado com o auxílio do Quest Graph™ LD50 Calculator (v.1).

Tabela 1- Disposição dos experimentos de capacidade de fertlização e embriotoxicidade.

Fertilização	Embriões em gástrula	Larva plúteos
Controle NSW	Controle NSW	Controle NSW
0,005 µg/mL nano-TiO_2	0,005 µg/mL nano-TiO_2	0,005 µg/mL nano-TiO_2
0,05 µg/mL nano-TiO_2	0,05 µg/mL nano-TiO_2	0,05 µg/mL nano-TiO_2
0,5 µg/mL nano-TiO_2	0,5 µg/mL nano-TiO_2	0,5 µg/mL nano-TiO_2
5 µg/mL nano-TiO_2	5 µg/mL nano-TiO_2	5 µg/mL nano-TiO_2
	Controle Positivo $CuSO_4$ (Calculado o EC_{50})	Controle Positivo $CuSO_4$ (Calculado o EC_{50})

3.5 Coleta dos gametas e teste de fertilização

Para verificar se as nano-TiO_2 teriam a capacidade de afetar o processo de fertilização, foram realizados ensaios de toxicidade para os espermatozoides. Para tanto, os gametas de indivíduos machos (*n*= 3) e fêmeas (*n*= 3) foram coletados após indução com injeção de cloreto de potássio (KCl) – 1 M (PINSINO *et al*., 2017). Os óvulos foram coletados diretamente em NSW e lavados 3 vezes por decantação, com intervalos de 45 min entre cada lavagem, e a concentração final foi ajustada para 600 embriões/mL. Após a coleta, os óvulos foram avaliados com relação à simetria e malformações. As secreções gonadais que apresentavam ovos irregulares foram descartadas. Os espermas foram coletados com a ajuda de uma pipeta *Pasteur* "a seco" diretamente dos gonóporos dos ouriços-do-mar e armazenados em 3 microtubos estéreis e mantidos em gelo até o uso.

Após a coleta dos gametas masculinos, para que fosse verificado se as diferentes concentrações de nano-TiO_2 afetariam a fertilização, foi feita a exposição dos espermatozoides adicionando 10 µL do pool de esperma seco em microtubos contendo 985 µL de NSW + 5 µL das diferentes concentrações de nano-TiO_2 (0,005, 0,05, 0,5 e 5 µg/mL) e incubados por 1 hora no escuro. Após 1 hora de exposição, foi avaliado a capacidade de fertilização dos espermatozoides adicionando 10 µL da solução de esperma (1:500) aos poços de 2 mL que continham 600 óvulos/mL.

A análise da fertilização foi realizada seguindo o método utilizado por Volpi Ghirardini *et al.*, (2005), com algumas modificações. Após 10 min da adição dos espermatozoides, as amostras

foram imediatamente fixadas com McDowell (McDowell e Trump, 1976) modificado, preparado em NSW. Os óvulos foram considerados fertilizados quando apresentavam elevação do envelope de fertilização e a presença do espaço perivitelínico. Os experimentos foram realizados em triplicata. Foram avaliados 100 indivíduos por réplica de maneira aleatória. O monitoramento da fertilização foi realizado sob microscopia óptica comum (Zeiss Standart 25) e o resultado expresso como percentual de óvulos fertilizados.

3.6 Ensaio Embriotóxico de nano-TiO_2

Após as coletas dos gametas (como descrito acima) foi realizada a fertilização com a adição de uma suspensão de espermatozoides (1:5000) à suspensão de óvulos (600 embriões/mL). Após 10 min foi quantificada a porcentagem de fertilizações bem-sucedidas. O ensaio foi considerado viável quando a taxa de fertilização foi ≥ 90%, sendo esta, confirmada pela elevação do envelope de fertilização. Logo após contagem e validação, os embriões foram dispostos em placas de cultura de 24 poços, a 25ºC com fotoperíodo (12 h claro e 12 h escuro). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, os embriões foram monitorados quanto à sincronia do desenvolvimento para verificar se todos encontravam-se no mesmo estágio de desenvolvimento.

O teste de embriotoxicidade seguiu o protocolo descrito por Della Torre *et al.*, (2014), com algumas modificações (temperatura e tempo de desenvolvimento). Após aproximadamente 12 hpf e 24 hpf, os embriões e larvas foram fixados com McDowell e o estágio de desenvolvimento e morfologia embrionária e larval foram analisados sob microscopia óptica comum utilizando-se o microscópio Zeiss Standart 25. O ensaio foi validado quando, pelo menos, 85% dos embriões e larvas do grupo controle não apresentaram alterações no desenvolvimento (estagiamento e morfologia). Os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final de cada experimento foram avaliados 100 indivíduos por réplica, levando em conta malformações nos embriões e larvas e o resultado foi expresso como percentual.

3.7 Análise morfológica

Nos intervalos de 12 e 24 hpf, embriões e larvas plúteos foram fixados com McDowell e a morfologia analisada sob microscopia de luz, considerando as malformações e os atrasos no desenvolvimento por meio de observação e fotodocumentação.

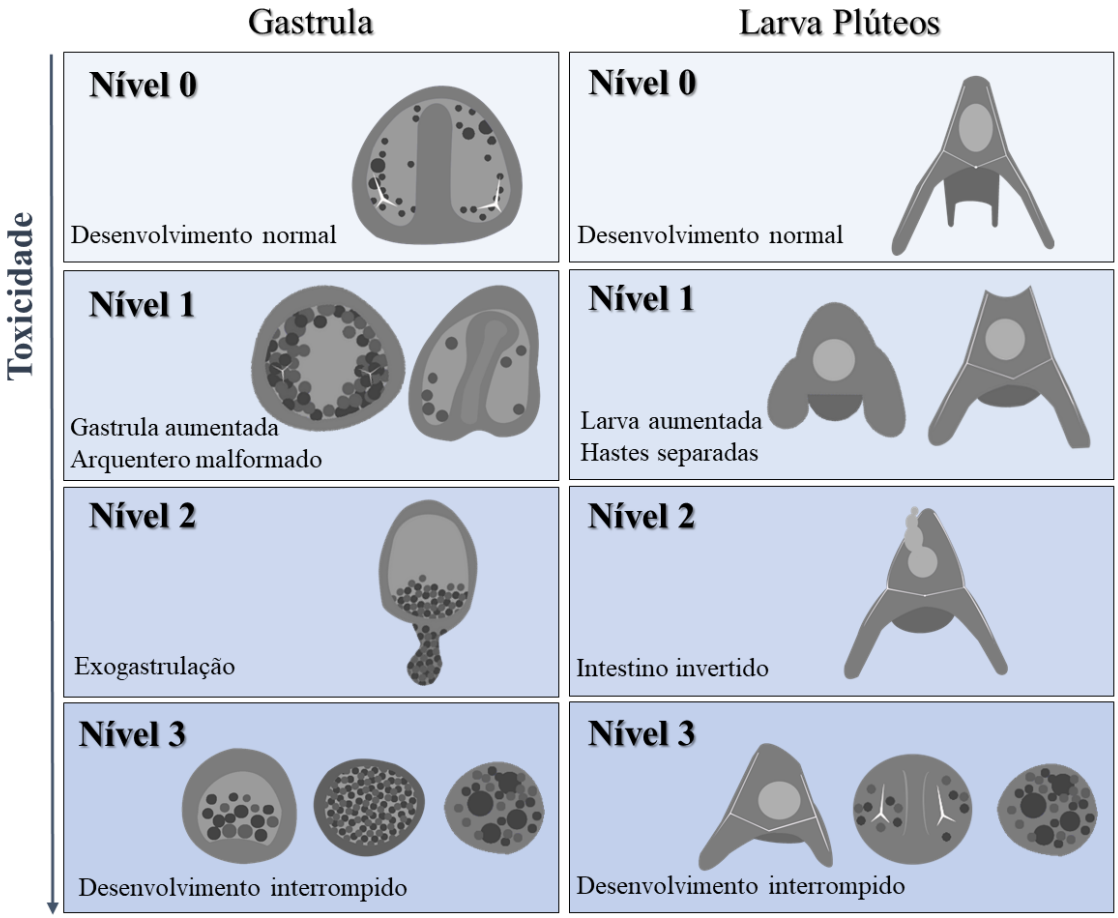
O critério de toxicidade foi quantificado segundo estabelecido por Carballeira *et al*. (2012), onde a gravidade das malformações apresentadas pelos embriões e larvas foram classificadas da seguinte forma: nível 0, nível 1, nível 2 e nível 3. Com base nas porcentagens de cada nível foi feito o cálculo do índice de toxicidade (IT), segundo a fórmula:

IT [0 x n nível 0 (%) + 1 x n nível 1 (%) + 2 x n nível 2 (%) + 3 x n nível 3(%)]/100

Levando em consideração cada concentração utilizada das nano-TiO_2. O valor do IT pode variar entre 0 (nenhuma toxicidade),1 (leve), 2 (moderado) e 3 (alto).

Para embriões foi considerado **nível 0:** gástrula bem desenvolvidas (com o arquêntero formado); **nível 1:** gástrula aumentada e malformação do arquêntero; **nível 2:** exogastrulação (embriões que apresentam o arquêntero projetado para fora); **nível 3:** embriões com desenvolvimento interrompido. Para larvas foi considerado **nível 0:** larvas plúteos bem desenvolvidas (com 4 braços formados e tamanho ≥ 180 μm); **nível 1:** larvas aumentadas e larvas com hastes separadas; **nível 2:** larvas com o intestino invertido (arquêntero projetado para fora); **nível 3:** larvas com desenvolvimento interrompido. A figura 7 ilustra os aspectos morfológicos utilizados na classificação dos níveis de toxicidade.

Figura 7- Classificação de embriões e larvas segundo o critério de toxicidade aplicado após exposição às nano-TiO_2.

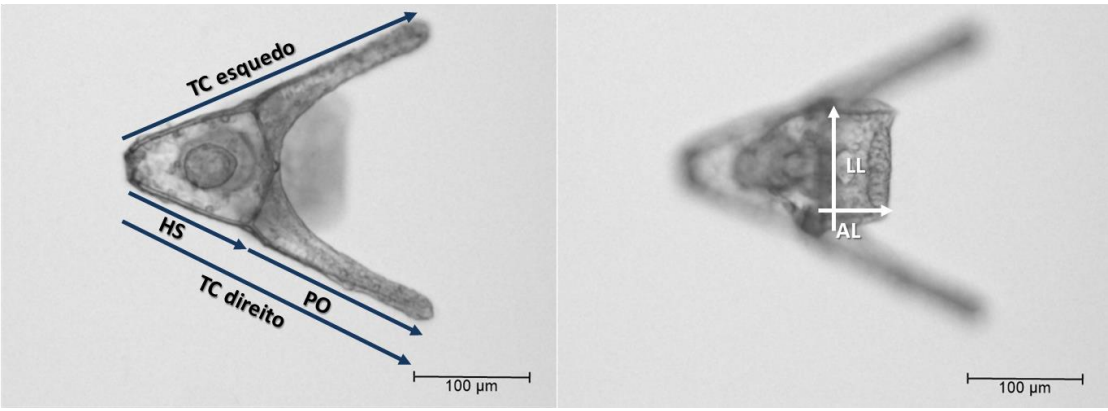


Fonte: Arquivo pessoal.

3.8 Análise morfométrica de larvas

Com auxílio do programa Fiji®, foram realizadas fotomicrografias das larvas em estágio de 24 hpf, e o tamanho total do corpo, das hastes somáticas, dos braço pós-oral, dos braço antero-lateral e da largura total da larva foram mensurados (≅ 250 por grupo) conforme mostrado na Figura 8. Somente as larvas que apresentavam tamanho ≥180 µm foram mensuradas, as larvas menores foram consideradas como plúteos jovem.

Figura 8- Parâmetros morfométricos analisados nas larvas de L. *variegatus* (24 hpf). Mensuração total do tamanho do corpo (TC), hastes somáticas (HS), braço pós-oral (PO), braço antero-lateral (AL) e largura da larva (LL) nas larvas de L. *variegatus.*



Fonte: Arquivo pessoal.

3.9 Analise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar alterações ultraestruturais induzidas pela exposição às nano-TiO_2, os embriões e larvas plúteos expostos e não expostos às nano-TiO_2 foram fixados em solução McDowell.

Para cada concentração de nano-TiO_2 foi feito um pool utilizando 500 µL de cada réplica dos grupos de 12 e 24 hpf. As amostras nos microtubos foram centrifugados a 2000g por 5 min a 4ºC para que ocorresse a formação de precipitado celular. Então, lavou-se as amostras em solução Ósmio-fosfato 1%, seguida da permanência em solução de ósmio-fosfato 1% por 2 h, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada uma lavagem rápida em solução de acetato de uranila 0,5%. As amostras permaneceram em acetato de uranila a 0,5% em solução de sacarose “overnight”. Após esse período, as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (2 x de 10 min em álcool 70%, 2 x de 10 min em álcool 95%, 4 x de 10 min em álcool 100%), seguida por 2 x de 10 min em óxido de propileno.

Após esse procedimento, as amostras foram infiltradas em óxido de propileno + Resina Spurr (Sigma) em partes iguais (1:1), com agitação por rotação durante 6 h em temperatura ambiente. Para a inclusão, as amostras foram colocadas em Resina Spurr pura "overnight" à temperatura ambiente. Depois desse período, foram dispostas em formas de silicone e levadas à estufa a 75ºC durante 48 h. Após a polimerização da resina, os blocos foram aparados e levados ao ultramicrótomo para obtenção de cortes de 90 nm de espessura. O contraste foi feito deixando os

cortes por 5 min em acetato de uranila, seguido por 5 min em citrato de chumbo. Os cortes ultrafinos foram fotografados no Microscópio Eletrônico FEI Tecnai G20 200 Kv e posteriormente analisados.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8. Os dados da análise DLS são relatados como média ± SD de 3 medições independentes. Os dados dos testes de capacidade de fertilização e embritoxicidade são expressos como % média ± SEM.

Os dados das análises morfométricas e da espícula são expressos como mediana e intervalo interquartil, e foram analisados para normalidade. Para dados paramétricos foram feitas as análises de variância de uma via (one-way-ANOVA) seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. O cálculo da EC_{50} foi realizado com o auxílio do Quest Graph™ LD50 Calculator (v.1). Para validar os testes, cada experimento foi realizado com 3 réplicas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização físico-química da nano-TiO_2

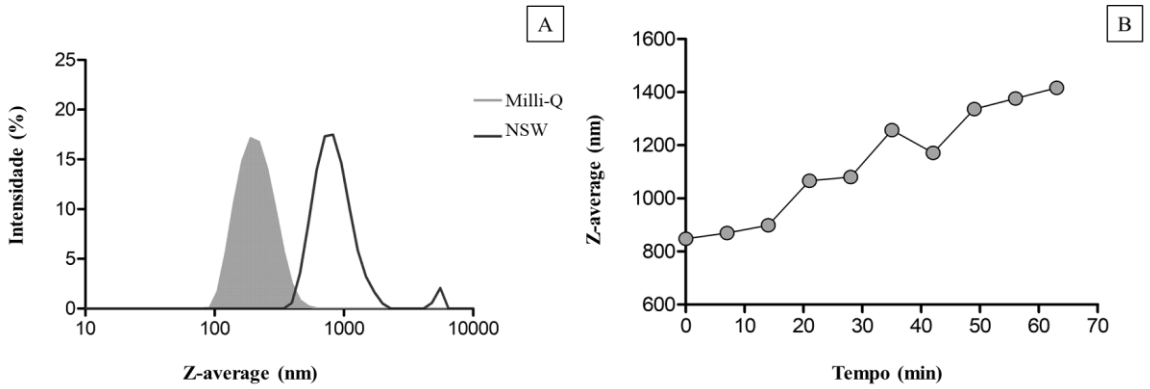
Os parâmetros relacionados ao tamanho da nano-TiO_2 (5 µg/mL) dispersas em dois meios: água Milli-Q® e NSW, estão representados na Tabela 2 e na Figura 9.

A Nano-TiO_2 formou aglomerações em nanoescala de cerca de 200 nm em água Milli-Q®, enquanto atingiram cerca de 950 nm em NSW (Tabela 2), como são relatadas as distribuições de tamanho da nano-TiO_2 ponderadas em intensidade nos dois meios (Figura 9A). Uma rápida aglomeração de nano-TiO_2 foi ainda mais observada em NSW, atingindo um tamanho de cerca de 1400 nm dentro de 1 h após a incubação, esse dado também pode ser apontado pelo valor de PDI, que em NSW foi > 0,3, o que mostra que as agregações da nano-TiO_2 podem ser maiores do que o tamanho apresentado pelo Z-average (Figura 9B). O potencial zeta (potencial ζ) indicou uma carga de superfície negativa da nano-TiO_2 em Milli-Q® (-52,5 ± 7 mV), enquanto diminuiu como valor absoluto em NSW (-8,3 ± 1 mV).

Tabela 2- Resultados da análise DLS, mostrando Z-average (nm), índice de polidispersidade (PDI) e potencial ζ (mV). Os dados (± SD médios de 3 medidas) são referentes a uma concentração de nano-TiO_2 de 5 µg/mL.

Meios de dispersão	Z-Average (nm)	PDI	Potential ζ (mV)
Milli-Q	204,30 ± 4,59	0,210 ± 0,015	-52,50 ± 6,95
NSW	944,60 ± 106,20	> 0,330	-8,34 ± 0,96

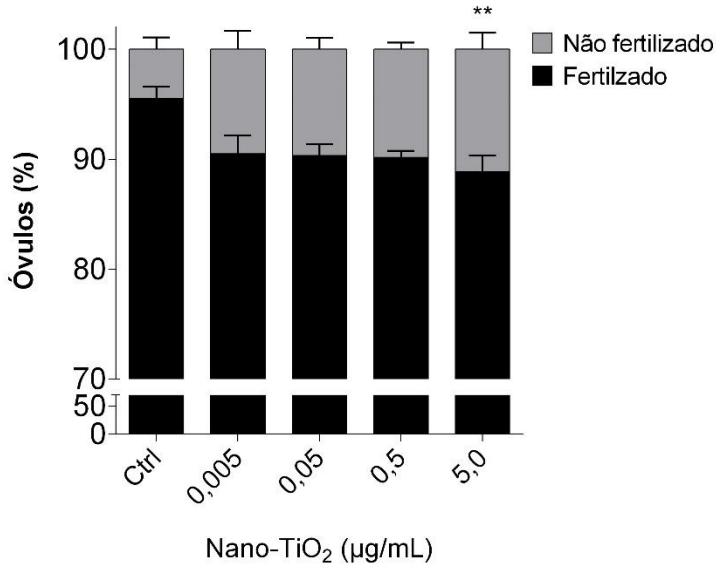
Figura 9- A: Distribuições de 3 medidas do tamanho da nano-TiO_2 (a 5 µg/mL) ponderadas por intensidade: comparação dos dados obtidos em análise DLS em água Milli-Q e NSW. Eixo-X mínimo em 10 nm (escala logarítmica); B: Aglomeração de nano-TiO_2 em NSW d dentro de 1 h a partir da preparação da suspensão. Análise DLS em intervalos de 7 min até 63 min.



4.2 Efeito da Nano-TiO_2 na Fertilização

Os resultados dos testes de capacidade de fertilização são mostrados na Figura 10. Os grupos experimentais expostos ao nano-TiO_2 mostraram uma diminuição no sucesso de fertilização de 7% (Min. 88,8 – Max. 90,5) vs grupo controle (95,5 ± 2% de sucesso de fertilização). Todos os grupos de espermatozoides que foram expostos a diferentes concentrações de nano-TiO_2 apresentaram uma queda na taxa de fertilização. No entanto, apenas a maior concentração nano-TiO_2 testada (5 µg/mL) afetou ligeiramente a capacidade de fertilização (88,8 ± 3% de ovos fertilizados), correspondente a uma diminuição ($p= 0,006$) em relação ao controle.

Figura 10- Índice de fertilização após 1h de exposição dos espermatozoides de L. *variegatus* nas diferentes concentrações de nano-TiO_2. Os dados são expressos como Média ± SEM (n = 300).



4.3 Efeito Embriotóxico de nano-TiO_2

Embriões em estágio de gástrula bem desenvolvida (12hpf) foram observados em todos os grupos (Fig. 11.A). O grupo controle apresentou uma média de 89,7% ± 2 de gástrulas bem desenvolvidas. Nos grupos expostos às nano-TiO_2 foi possível observar uma diminuição no percentual de gástrulas; essa diminuição demonstrou-se mais acentuada na concentração ambiental (0,005 µg/mL), com queda de aproximadamente 22% em relação ao controle com 67,7% ± 4 de gástrulas bem desenvolvidas (p= 0,0002). Os demais grupos testados também apresentaram uma diminuição no percentual de gástrulas bem formadas: o grupo 0,05 µg/mL com uma média de 76,7% ± 4 de gástrulas bem formadas (p= 0,01); o grupo 0,5 µg/mL com 75% ± 1 (p= 0,004); o grupo 5 µg/mL com 76% ± 4 (p= 0,007).

Os resultados obtidos com o critério de toxicidade nos embriões estão representados na Figura 11.B e retratados com imagens dos diferentes graus de malformações na Figura 12. Os dados mostraram que dentre os níveis de toxicidade (1 a 3) o único que apresentou diferença com relação ao controle foi o nível 3, levando em consideração que o nível 0 representa embriões sem alterações (gástrulas bem desenvolvidas). No nível 3 foi observado um elevado percentual de embriões com desenvolvimento interrompido em todos os grupos expostos às nano-TiO_2, principalmente na concentração ambiental. Os grupos expostos às nano-TiO_2 apresentaram os seguintes percentuais

de malformação: 25,3 ± 3% (0,005 µg/mL; p= < 0,0001); 15,3 ± 1,5% (0,05 µg/mL; p= 0,01; 19 ± 2,6% (0,5 µg/mL; p= 0,001); e 17,3 ± 3,5% (5 µg/mL; p= 0,002).

Figura 11- Embriões de L. *variegatus* após exposição às nano-TiO_2. A: Porcentagem de embriões em estágio de gástrula bem desenvolvidas após exposição. B: Níveis representando grau de toxicidade de embriões expostas às nano-TiO_2. Dados apresentados em Média ± SEM (n= 300).

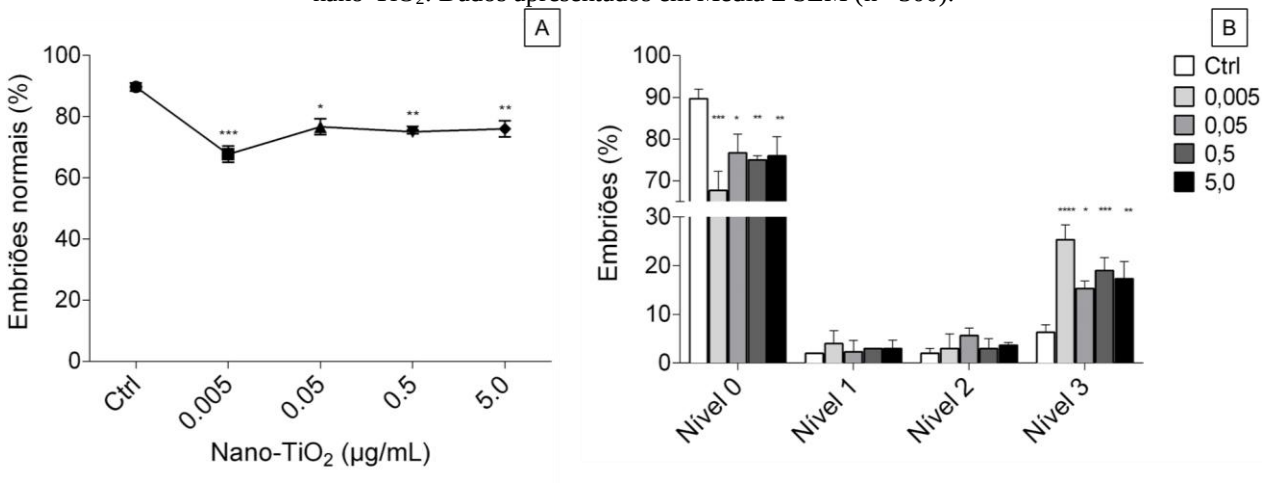
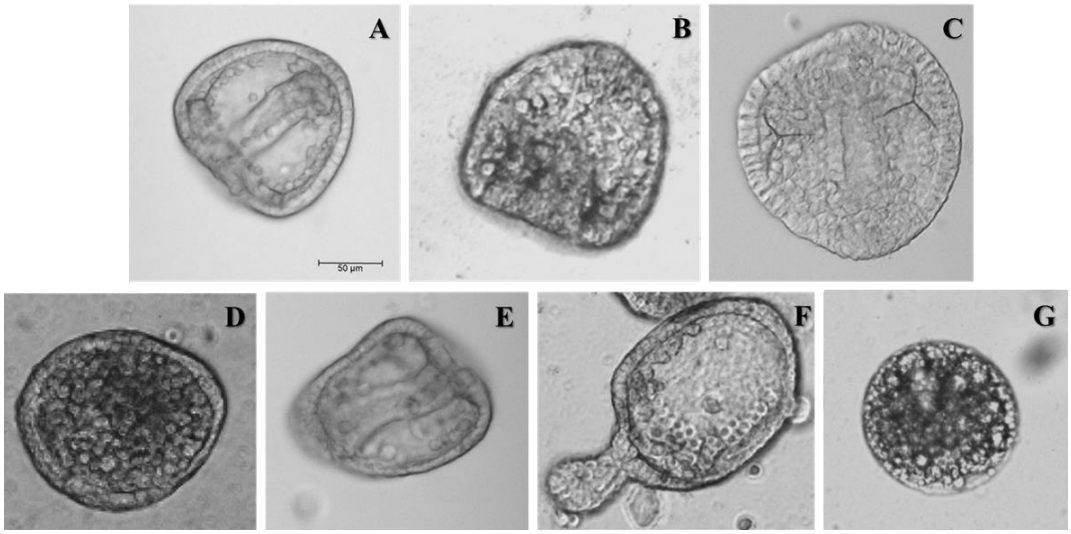


Figura 12- Fotomicrografia de contraste interferencial de fase de embriões em gastrula de L. *variegatus* 12 hpf. A: embrião em estágio de gástrula bem desenvolvida; B: gástrula inicial; C: gástrula aumentada; D: blástrula; E: embrião com malformação do arquêntero; F: exogastrulação; G: desenvolvimento interrompido. Microscopia de luz campo claro. Barra de escala: 50 µm.



Larvas plúteos bem desenvolvidas foram observadas em todos os grupos (Fig. 13.A). O grupo controle apresentou 89% ± 2 de larvas bem desenvolvidas. Nos grupos expostos às nano-TiO_2 houve uma diminuição no percentual destas; essa diminuição mostrou-se mais acentuada na exposição à concentração mais alta (5 µg/mL), com queda de aproximadamente 20% em relação ao controle com 68,9% ± 9 (p= 0,005). Nos demais grupos expostos não houve diferença.

Os resultados obtidos com o critério de toxicidade nas larvas plúteos estão representados na Figura 13.B e retratados com imagens dos diferentes graus de malformações na Figura 14.

Os dados mostraram que dentre os níveis (1 a 3), sendo que o nível 0 é constituído somente com larvas bem formadas (sem alterações), no nível 1 houve um elevado percentual de larvas com malformações, porém não foi significativo. O nível 2 também não apresentou diferença. O nível 3 foi o único que apresentou diferença com relação ao controle, porém apenas na concentração mais alta (5 µg/mL) foi possível observar que houve grande número de larvas com o desenvolvimento interrompido, onde a concentração de nano-TiO_2 foi a mais tóxica no estágio larval. O percentual de malformação do grupo 5 µg/mL no nível 3 foi de 30,4 ± 9 % (p= < 0,02).

Figura 13- Larvas plúteos bem desenvolvidas de L. *variegatus* após exposição às nano-TiO_2. A: Porcentagem de larvas bem desenvolvidas após exposição. B: Níveis representando grau de toxicidade de larvas expostas às nano-TiO_2. Dados apresentados em Média ± SEM (n=300)

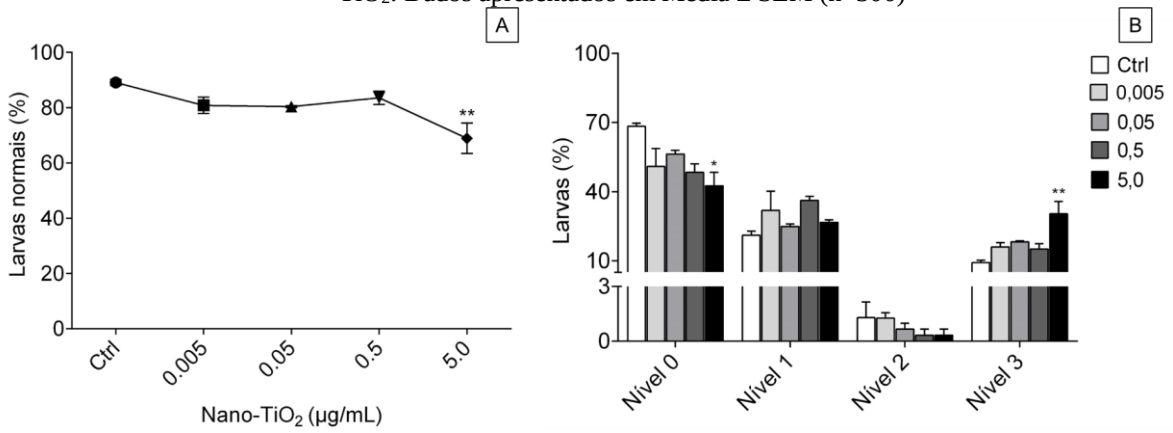
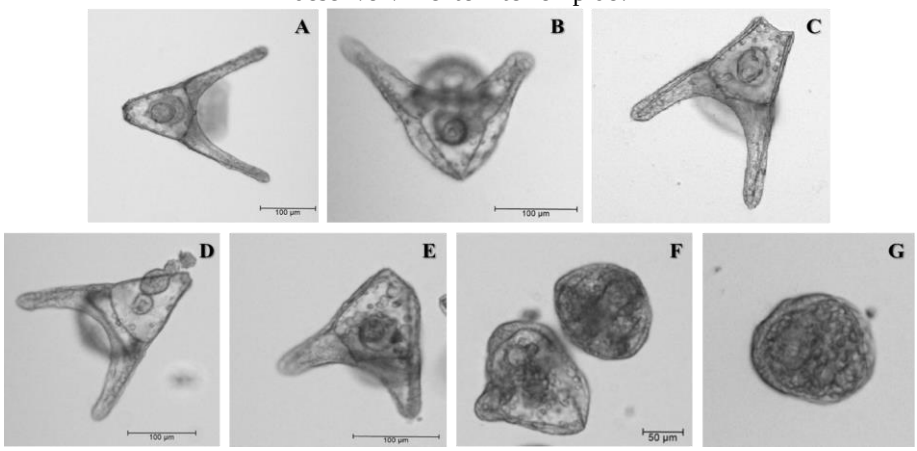


Figura 14 - Fotomicrografia de contraste interferencial de fase de larvas plúteos de L. *variegatus* 24hpf. A: larva bem desenvolvida; B: larva aumentada; C: hastes separadas; D: larva com intestino invertido; E: plúteos jovem; F e G: desenvolvimento interrompido.



4.4 Índice de Toxicidade (IT) para Embriões e Larvas

De acordo com as alterações observadas foi calculado o IT de cada concentração de nano-TiO_2 nos dois estágios de desenvolvimento, como mostra a Tabela 3.

Os embriões expostos às maiores concentrações de nano-TiO_2 (0,05, 0,5 e 5 µg/mL) apresentaram o valor de IT em torno de 0,6, correspondendo a uma toxicidade leve. Entretanto, a concentração ambiental (0,005 µg/mL) foi a que mostrou o valor mais alto de IT (0,8), se mostrando mais tóxica para os embriões no estágio de gástrula. Já para as larvas, as expostas às menores concentrações de nano-TiO_2 (0,005, 0,05 e 0,5 µg/mL) apresentaram o valor de IT em torno de 0,8. Contudo, para as larvas expostas a concentração mais alta (5 µg/mL) o IT foi de 1,2, demonstrando um grau de severidade maior das nano-TiO_2, sendo a concentração mais tóxica para as larvas.

Tabela 3- Toxicidade da nano-TiO_2 de acordo com o índice de toxicidade (IT) calculado de acordo com os níveis de malformações em embriões no estágio de gástrula e em larvas plúteos.

Nano-TiO_2 (µg/mL)	**Gástrula (IT)**	**Larva Plúteos (IT)**
0,005	0,86	0,82
0,05	0,60	0.81
0,5	0,66	0,82
5	0,62	1,2

4.5 Efeito do nano-TiO_2 na morfologia da larva

A morfometria obtida através da mensuração das larvas indicou diferença significativa nos tamanhos da larva entre os grupos expostos às nano-TiO_2 e o grupo controle (Figura 15).

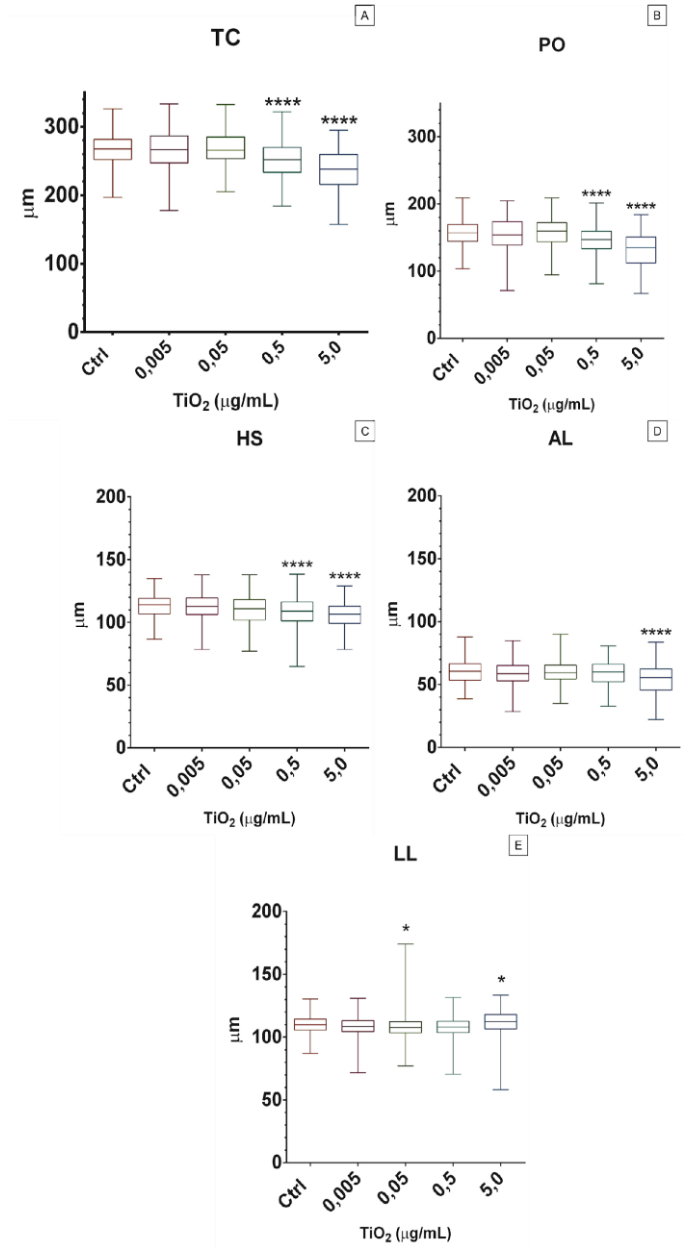
As concentrações mais altas de nano-TiO_2 (0,5 e 5 µg/mL) foram capazes de induzir diferenças morfométricas no tamanho do corpo das larvas (Figura 15.A), demonstrando um declínio significativo no tamanho (≅ 22 µm) em relação ao grupo controle (p= <0,0001). As demais concentrações (0,005 e 0,05 µg/mL) não apresentaram efeito sobre o tamanho do corpo das larvas.

Mensurações realizadas nos braços pós-oral das larvas (Figura 15.B) indicaram um padrão parecido ao observado no tamanho corporal. Houve uma redução no comprimento dos braços pós-oral (≅ 17 µm) nas larvas expostas às duas maiores concentrações de nano-TiO_2 (0,5 e 5 µg/mL), com relação grupo controle (p= <0,0001). As concentrações menores não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle.

O mesmo comportamento, acima descrito para tamanho corporal e para os braços pós-oral, foi observado para o comprimento das hastes somáticas das larvas expostas às concentrações 0,5 e 5 µg/mL (Figura 15.C), que apresentaram um menor comprimento (≅ 5 µm) do que o grupo controle (p= <0,0001). Não foi observada diferença entre o comprimento dos braços antero-lateral das larvas expostas às menores concentrações de nano-TiO_2 em relação ao grupo controle (Figura 15.D). No entanto, o grupo exposto à concentração mais alta de nano-TiO_2 (5 µg/mL) apresentou um comprimento reduzido (≅ 5 µm) dos braços antero-lateral em relação ao grupo controle (p = <0,0001).

A largura das larvas (Figura 15.E), demonstrou que a exposição às nano-TiO_2, foi capaz de induzir um leve aumento (± 2 µm) nas larvas expostas a 0,05 µg/mL (p= 0,01) e 5 µg/mL (p= 0,02) em relação ao controle.

Figura 15- Mensuração de larvas plúteos de L. *variegatus* 24hpf após exposição a diferentes concentrações de nano-TiO_2. A: tamanho do corpo (TC); B: braço pós-oral (PO); C: hastes somáticas (HS); D: braço antero-lateral (AL); E: largura da larva (LL). Cada dado está expresso em Min - Max. (n ≅ 250).



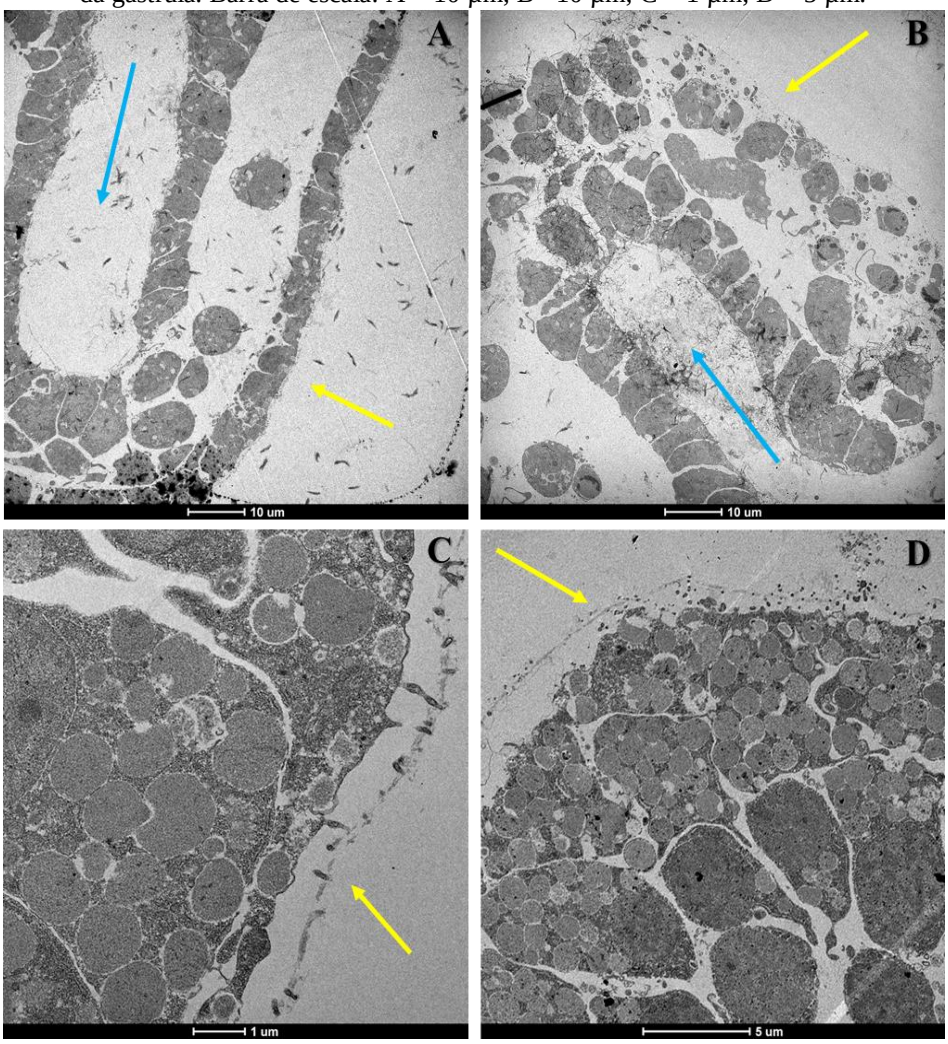
4.6 Efeito da nano-TiO_2 por MET

Das amostras de embriões em estágio de gástrula, foi possível a observação dos cortes ultrafinos somente do grupo controle e do grupo exposto à concentração 0,05 µg/mL de nano-TiO_2 (Figura 16). Das amostras de larvas, foi possível a observação dos cortes ultrafinos somente do grupo controle e do grupo exposto à concentração 5 µg/mL de nano-TiO_2 (Figura 17).

Na Figura 16.A, que representa uma gástrula do grupo controle, pode ser observado o arquêntero formado (seta azul) e, acima das células que constituem a ectoderma, uma fina camada com pequenos pontos sugestivos de cílios da gástrula (seta amarela). Na Figura 16.B, grupo exposto à concentração de 0,05 µg/mL de nano-TiO_2, pode-se observar a formação do arquêntero (seta azul); entretanto, na parte externa do ectoderma da gástrula, a fina camada acima da membrana (seta amarela) está mais afastada indicando um descolamento da mesma, e os pontos (sugestivos de cílios), mostram-se danificados quando comparados à imagem do controle.

A diferença da camada acima do ectoderma entre o grupo controle e o exposto pode ser melhor observada comparando as Figuras16.C (controle) e 16.D (nano-TiO_2 0,05 µg/mL). No entanto, na concentração de 0,05 µg/mL não foi possível ver adsorção ou absorção de nano-TiO_2 nos embriões.

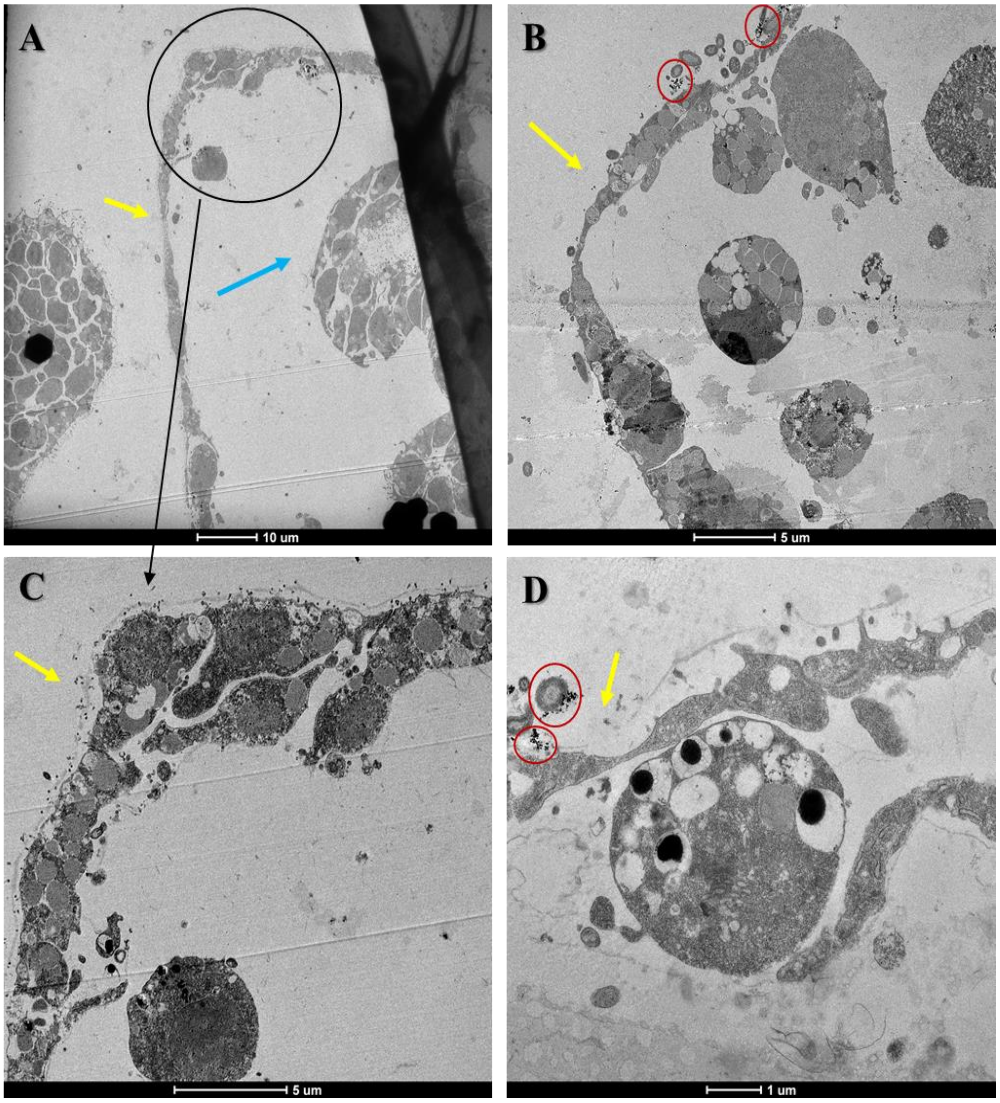
Figura 16 - Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de embriões de embriões de L. *variegatus* em estágio de gástrula. Cortes ultrafinos. A: grupo controle; aumento de 550x; B: grupo exposto à concentração de 0,05 µg/mL de nano-TiO_2; aumento de 550x; C: grupo controle; aumento de 5000x; D: grupo exposto à concentração de 0,05 µg/mL de nano-TiO_2; aumento de 2100x. A seta azul indica o arquêntero formado; A seta amarela indica a camada de cílios da gástrula. Barra de escala: A = 10 µm; B =10 µm; C = 1 µm; D = 5 µm.



Ao analisar as imagens de microscopia da Figura 17.A, que representa uma larva do grupo controle, pode-se observar a parte superior da larva com o intestino no centro (seta azul), além da fina camada com pequenos pontos sugestivos de cílios da larva (seta amarela). A Figura 17.B, é uma larva do grupo exposto à concentração de 5 µg/mL de nano-TiO_2, pode-se observar a camada de cílios danificada (seta amarela), na superfície externa do ectoderma da larva, observam-se aglomeração de partículas eletrodensas, com dimensão compatível com as nano-TiO_2, e que sugerem ser agregados destas nanopartículas.

A Figura 17.C é a mesma foto do grupo controle, porém aproximada para melhor observação da presença da camada dos “cílios” (seta amarela). Na Figura 17.D, grupo exposto à 5 µg/mL de nano-TiO_2, pode-se observar com maior proximidade a agregação de nano-TiO_2 na superfície externa do ectoderma da larva (círculo vermelho) e a camada de cílios danificada (seta amarela).

Figura 17- Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de *L. variegatus* em fase larval. Cortes ultrafinos. A: grupo controle de larva plúteos em 550x, pode-se observar o intestino da larva (seta azul); B: grupo exposto a concentração de 5 µg/mL de nano-TiO_2 em 1500x, possível agregação de nano-TiO_2 ao redor da larva (círculo vermelho); C: mesma foto do grupo controle com zoom de 2100x; D: grupo exposto a concentração de 5 µg/mL de nano-TiO_2 em 5000x, possível agregação de nano-TiO_2 ao redor da larva (círculo vermelho). Barra de escala: A = 10 µm; B = 5 µm; C = 5 µm; D = 1 µm. Seta amarela: camada de cílios da larva.



5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o impacto das nanopartículas de Dióxido de Titânio, comumente encontradas em produtos de uso antrópico, e demonstrou efeitos tóxicos sobre a fertilização e durante estágios embrionários e larvais do desenvolvimento de ouriço-do-mar tropical *Lytechinus variegatus*, como malformações e atraso no seu desenvolvimento.

Muitos estudos têm demonstrado os efeitos deletérios de diferentes nanopartículas sobre o desenvolvimento de ouriços do mar de diferentes espécies, como *Paracentrotus lividus* (DELLA TORRE *et al.*, 2014; MESARIC *et al*., 2015; OLIVIERO *et al*., 2019), *Strongylocentrotus intermedius* (PIKULA *et al.* 2020), *Arbacia lixula* (MAISANO *et al*., 2015; CAPPELLO *et al*., 2017) e *Lytechinus pictus* (FAIRBAIRN *et al.*, 2011; WU *et al*., 2015; TORRES-DUARTE *et al*., 2015), contudo, não existem estudos demonstrando quais seriam os efeitos de nanopartículas no desenvolvimento de ouriços-do-mar de espécies tropicais.

Dado o grau de relevância que vem sendo empregado aos nanomateriais, e sua ampla utilização, o presente trabalho é o primeiro a investigar os efeitos da nano-TiO_2 no ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* de ambiente tropical, utilizando o seu desenvolvimento embrionário e larval como modelo experimental.

Durante as exposições em NSW, nano-TiO_2 mostrou fácil formação de aglomerados e sedimentação, também relatado por Fairbairn *et al* (2010), Hu *et al*. (2018) e Ciacci *et al*. (2019), especialmente em concentrações mais elevadas. As análises da DLS determinaram que nano-TiO_2 (5 μg/mL) agrega mais facilmente na água do mar, formando rapidamente aglomerações de ≅ 900 nm, tamanho semelhante de aglomerado de nano-TiO_2 (10 μg/mL) foi relatado por Barmo *et al*. (2013) e Della Torre *et al*. (2015) em ASW (água artificial do mar). Após 1h de incubação a nano-TiO_2 formou aglomerações de ≅ 1400 nm (5 μg/mL), Gambardella *et al*. (2015) mostraram um tamanho semelhante de nano-TiO_2 ≅ 1500 nm após 1h em NSW do mar mediterrâneo, no entanto, foi em uma concentração muito alta (100 μg/mL).

No presente estudo, as nano-TiO_2 dispersas em NSW perderam negatividade (potencial ζ) de sua carga superficial, provavelmente devido às interações com compostos iônicos presentes na NSW deixando as nano-TiO_2 menos estáveis ao mudar a espessura da dupla camada elétrica, já que a ionização da superfície externa controla a carga superficial das nanopartículas (JIANG; OBERDORSTER; BISWAS, 2009; MORRISON; ROSS 2002).

A carga superficial, que depende fortemente do pH, da força iônica e da salinidade, desempenha um papel determinante na estabilidade da dispersão eletrostática das partículas (revisado em: CORSI, *et al.*, 2014), Jiang, Oberdorster e Biswas (2009) afirmaram que a carga superficial de NPs como de TiO_2, podem alterar conforme o pH do meio, podendo apresentar a carga superficial mais positiva em pH mais baixo e mais negativa em pH mais alto, o que corrobora com o comportamento da nano-TiO_2 na NSW (pH era 7.8 ± 0.2) deste estudo, visto que a carga superficial da nano continuou negativa em um pH alto.

Baker, Tyler e Galloway (2014), citaram que as NPs com carga superficial mais negativa causa maior agregação e consequentemente sedimentação mais rápida, o que também pode explicar o rápido comportamento de aglomeração das nano-TiO_2, já que mesmo perdendo negatividade na carga superficial continuou negativa em NSW medindo -8 mV.

A exposição das nano-TiO_2 nos espermatozoides, afetaram a capacidade de fertilização do *L. variegatus* no grupo de 5 µg/mL de nano-TiO_2. Desta forma, o efeito da nano-TiO_2 sobre os espermatozoides poderia estar correlacionado a uma diminuição da motilidade, ou até mesmo viabilidade dos espermatozoides, todavia mais estudos são necessários. A investigação do efeito das NPs sobre os espermatozoides é de extrema importância, visto que a queda no sucesso de fertilização poderia comprometer a permanência das espécies.

No entanto, a capacidade de fertilização dos espermatozoides não foi afetada àqueles expostos a concentrações mais baixas (0,005, 0,05 e 0,5 µg/mL). Esses dados estão de acordo com os observados por Pikula *et al.*, (2020), na exposição de espermatozoides do ouriço-do-mar *S. intermedius* do mar japonês em concentrações de nano-TiO_2 (0,1 - 25 µg/mL), e Gambardella *et al.* (2015), que relataram que espermatozoides de ouriço-do-mar mediterrâneo *P. lividus*, expostos às nano-TiO_2 (0,0001 - 1 µg/mL), não apresentaram alteração na capacidade de fertilização, porém interferiram nos processos de biomineralização durante o desenvolvimento larval. Manzo *et al*., (2013) sugeriram que a resistência que os espermatozoides apresentam no sucesso de fertilização poderia estar associada ao curto período de exposição aos tóxicos e a alta diferenciação celular que eles possuem.

Para melhor categorizar o efeito da nano-TiO_2 sobre o desenvolvimento do *L. variegatus*, foi utilizado o IT sugerido por Carballeira *et al.*, (2012), adaptado para dois estágios diferentes do desenvolvimento, embriões em gástrula e larvas, uma vez que este método consegue abordar de maneira eficiente e demonstrar o grau de toxicidade induzida pela nano-TiO_2 no desenvolvimento.

Os embriões demonstraram um alto grau de severidade de malformações em todas as concentrações de nano-TiO_2, mas principalmente na concentração ambiental (0,005 µg/mL), entretanto, as larvas demonstraram maior grau de severidade apenas na concentração mais alta (5 µg/mL), sugerindo que a intensidade e os efeitos deletérios da nano-TiO_2 dependem não apenas da concentração, mas também do estágio do desenvolvimento no qual a espécie se encontra. Gambardella *et al.,* (2013) propuseram que o efeito nocivo exercido pelas NPs em menores concentrações poderia ser explicado pela baixa probabilidade de formação de aglomerados, mantendo seu tamanho nanométrico, facilitando sua internalização pelas células, e quando estão altamente concentradas se aglomeram mais facilmente, o que poderiam dificultar a internalização em função do seu tamanho (HUANG *et al*., 2002). Entretanto, mesmo que os embriões de *L. variegatus* tenham demonstrado maior sensibilidade a nano-TiO_2 em menores concentrações, não foi observado a internalização nas amostras de 0,05 µg/mL nas análises de MET.

Comparando o efeito da concentração ambiental entre embriões e larvas, foi observado que a porcentagem de efeito deletério nas larvas é menor do que nos embriões, sendo que as larvas passaram por esta mesma fase. Diante disso, levantou-se a hipótese de que com o decorrer do desenvolvimento para o estágio larval o organismo consiga se recuperar devido a sua plasticidade entre os dois estágios. Desta forma, isso refletiria em um menor efeito deletério na fase larval em concentrações mais baixas, que pode estar relacionado com a plasticidade larval do ouriço-do-mar mascarando os efeitos das exposições, como sugerido por Gambardella *et al.,* (2015). Entretanto, Pikula *et al.* (2020), mostraram que o efeito tóxico tem um aumento significativo dependente do tempo de exposição do *S. intermedius* expostos a nano-TiO_2.

As larvas apresentaram ser mais sensíveis na concentração mais alta (5 µg/mL) com maior taxa de malformação. Nesta concentração a presença de aglomerações da nano-TiO_2 foi visível, o que poderia explicar o resultado oposto aos embriões, pois, levando em consideração que as larvas são filtradoras não seletivas, estas poderiam absorver com maior facilidade as NPs em forma de aglomerados pela abertura do trato digestório primitivo da larva, resultando em um maior impacto no desenvolvimento mais tardio, como por exemplo na biomineralização. Isso poderia justificar as malformações observadas nos braços das larvas, como: braços assimétricos ou não desenvolvimento do braço pós-oral.

Foi relatado, em trabalhos anteriores com outras NPs metálicas, que as larvas de ouriço-do-mar expostas ao nanocontaminante apresentaram como malformação como, braços mais curtos

quando comparados ao grupo controle (MAISANO *et al*., 2015; TORRES-DUARTE *et al*., 2015). Gambardella *et al.,* (2015), descreveram malformações semelhantes durante o desenvolvimento do *P. lividus* após exposição à nano-TiO_2 (0,0001 - 1 µg/mL): desagregação de células ectodérmicas na gástrula e braços assimétricos, mal desenvolvidos, ou desmineralização da larva. Essas malformações corroboram com os dados aqui apresentados, mostrando que apesar do ambiente distinto no qual essas duas espécies vivem, a presença de nano-TiO_2 foi capaz de induzir um efeito deletério no desenvolvimento embrionário e larval de ambas espécies.

A análise de MET indicou que nano-TiO_2 induziu alterações danificando as células da ectoderme e o cílios dos embriões em gástrula (0,05 µg/mL) e larvas plúteos (5 µg/mL). Picchietti *et al*. (2017) também relataram danos nas membranas celulares após a exposição à nano-TiO_2+ cloreto de cádmio nas células de robalo. Não foram observadas adsorção ou absorção de aglomerados da nano-TiO_2 na gástrula. No entanto, nas larvas foi observada uma possível adsorção de aglomerações nano-TiO_2 no lado externo do ectoderme das larvas. Estas aglomerações presentes nas imagens de MET mostraram a mesma aparência que as observadas por Ciacci *et al.,* (2012) em hemócitos de moluscos expostos *in vitro*, e por Barmo *et al.,* (2013) em células digestivas e lisossomos de moluscos expostas *in vivo*, sugerindo assim que a nano-TiO_2 possui uma alta capacidade de interação com membranas biológicas.

Estudos mais aprofundados são necessários para melhor compreender como os efeitos deletérios causados por este nanocontaminante comprometem a fisiologia dos embriões e larvas, e se o ecossistema marinho de regiões tropicais seria mais suscetível a sofrer danos do que o ecossistema de outros ambientes.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo foi o primeiro a investigar os efeitos da nano-TiO_2 no ouriço-do-mar de ambiente tropical *Lytechinus variegatus*, demonstrando que a nano-TiO_2 foi capaz de diminuir o sucesso de fertilização em concentração de exposição aguda de 5 µg/mL.

Baseado em informações morfológicas, o estudo apontou o potencial de toxicidade da nano-TiO_2, mostrando efeitos deletérios durante o estágio embrionário, que induziu malformações e atraso/bloqueio no desenvolvimento principalmente em concentrações ambientalmente realistas. Além de também alterar a morfologia das larvas, principalmente nos braços pós-oral e induzir malformações e atraso/bloqueio no desenvolvimento, só que em cenários de exposição aguda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAT BIOQUEST, Inc. *Quest Graph™ LD50 Calculator (v.1)."*. Disponível em:https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator-v1. Acesso em: Jun 2020.

ALLEN, J. D. Size-specific predation on marine invertebrate larvae. **Biol Bull,** v.214, p.42–49. 2008.

BAKER, T. J.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. **Environmental Pollution.** v.186, p. 257-71. 2014.

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_2 on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. **Aquat. Toxicol.** v.132-133, p.9–18, 2013. DOI:10.1016/j.aquatox.2013.01.014.

BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. **Acc. Chem. Res.** v.46, n.3, p.854-862, 2013.

BERGAMI E.; PUGNALINI S.; VANNUCCINI M. L.; MANFRA L., FALERI, C.; SAVORELLI F.; DAWSON K. A.; CORSI, I. Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana.* **Aquat. Toxicol.** v.189, p.159–169, 2017. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.06.008.

BLASCO, J.; CORSI, I.; MATRANGA, V. Particles in the oceans: implication for a safe marine environment. **Marine Environmental Research.** v. 111, p.1-4, 2015.

BOURGEAUL, A.; COUSIN, C.; GEERTSEN, V.; CASSIER-CHAUVAT, C.; CHAUVAT, F.; DURUPTHY, O.; CHANÉAC, C.; SPALLA, O. The Challenge of Studying TiO_2 Nanoparticle Bioaccumulation at Environmental Concentrations: Crucial Use of a Stable Isotope Tracer. **Environ. Sci. Technol**. v.49, n.4, p.2451–2459, 2015.

BONAVENTURA, R.; MATRANGA, V. Overview of the molecular defense systems used by sea urchin embryos to cope with UV radiation. **Marine Environmental Research.** v.128, p.25-35. 2017.

BONAVENTURA, R.; ZITO, F.; MORRONI, L.; PELLEGRINI, D.; REGOLI, F.; PINSINO, A. Development and validation of new analytical methods using sea urchin embryo bioassay to evaluate dredged marine sediments. **J Environ Manage.** v.281, p.111862, 2021. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111862.

BOYKOV, I. N.; SHUFORD, E.; ZHANG, B. Nanoparticle titanium dioxide affects the growth and microRNA expression of switchgrass (*Panicum virgatum*). **Genomics**. v.111, n.3, p.450–456, 2019. DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.03.002.

BRUNELLI, A.; POJANA, G.; CALLEGARO, S.; MARCOMINI, A. Agglomeration and sedimentation of titanium dioxide nanoparticles (n-TiO_2) in synthetic and real waters. **J. Nanopar. Res.** v.15, p.1684, 2013.

BUTTINO, I.; HWANG, J.; ROMANO, G.; SUN, C.; LIU, T.; PELLEGRINI, D.; GAION, A.; SARTORI, D. Detection of malformations in sea urchin plutei exposed to mercuric chloride using different fluorescent techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.123, p.72–80, 2016.

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

CANESI, L.; CIACCI, C.; VALLOTTO, D.; GALLO. G.; MARCOMINI, A.; POJANA, G. *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO_2, SiO_2) on *Mytilus* hemocytes. **Aquatic Toxicology.** v.96, n.2, p.151-158, 2010.

CAPPELLO, T.; VITALE, V.; OLIVA, S.; VILLARI, V.; MAUCERI, A.; FASULO, S.; MAISANO, M. Alteration of neurotransmission and skeletogenesis in sea urchin *Arbacia lixula* embryos exposed to copper oxide nanoparticles. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.199, p.20–27, 2017.

CARBALLEIRA, C.; RAMOS-GOMEZ, J.; MARTIN-DIAZ, L.; DELVALLS, T. A. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: application to marine pisciculture effluents. **Mar. Environ. Res**. v.77, p.12–22, 2012.

CARLSON, C.; HUSSAIN, S. M.; SCHRAND, A. M.; BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HESS, K. L.; JONES, R. L.; SCHLAGER, J. J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **Journal of Physical Chemistry B**. v.112, n.43, p.13608-13619, 2008.

CARP, O.; HUISMAN, C. L.; RELLER, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. **Prog. Solid State Chem.** v.32, p.33–77, 2004.

CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. **Chem. Rev.** v.107, p.2891– 2959, 2007. DOI: 10.1021/cr0500535

CIACCI, C.; CANONICO, B.; BILANIĈOVĂ, D.; FABBRI, R.; CORTESE, K.; GALLO, G.; MARCOMINI, A.; POJANA, G.; CANESI, L. Immunomodulation by different types of n-oxides in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. **PLoS ONE.** v.7, n.5, p.36937, 2012.

CIACCI, C.; GRIMMELPONT, M. V.; CORSI, I.; BERGAMI, E.; CURZI, D.; BURINI, D. Nanoparticle-biological interactions in a marine benthic foraminifer. **Sci. Rep.** v.9, p.19441, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-56037-2

CONWAY, J. R.; HANNA, S. K.; LENIHAN, H. S.; KELLER, A. A. Effects and implications of trophic transfer and accumulation of CeO_2 nanoparticles in a marine mussel. **Environ. Sci. Technol.** v.48, p.1517–1524, 2014.

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.9694-709, 2014.

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, p.60. 2020. DOI:10.3389/fenvs.2020.00060

DAN, J. C. Acrosome reaction and lysins. **Fertilization**, Academic Press, New York, v.1, p.237–367, 1967.

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.

DELLA TORRE, C.; BERGAMI, E.; SALVATI, A.; FALERI, C.; CIRINO, P.; DAWSON, K. A.; CORSI, I. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. **Environmental Science & Technology**. v.48, p.12302–12311, 2014.

DECKER, G. L.; LENNARZ, W. J. Skeletogenesis in the sea urchin embryo. **Develop-ment.** v.103, p.231–247, 1988.

DINNEL, P. A.; LINK, J. M.; STOBER, Q. J. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. **Arch EnvironContam Toxicol.** v.16, p.23–32, 1987.

DINNEL, P. A.; LINK, J. M.; STOBER, Q. J.; LETOURNEAU, M. W.; ROBERTS, W. E.Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. **Arch Environ Contam Toxicol**. v.18, p.7482755, 1989.

DOYLE, J. J.; PALUMBO, V.; HUEY, B. D.; WARD, J. E. Behavior of titanium dioxide nanoparticles in three aqueous media samples: agglomeration and implications for benthic deposition. **Water Air Soil Pollut.** v.225, p.1–13, 2014.

FAIRBAIRN, E. A.; KELLER, A. A.; MÄDLER, L.; ZHOU, D.; POKHREL, S.; CHERR, G. N. Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological

response in sea urchin development. **Journal of Hazardous Materials.** v.192, n.3, p.1565–1571, 2011. DOI:10.1016/j.jhazmat.2011.06.080.

FITZPATRICK, J. L.; NADELLA, S.; BUCKING, C.; BALSHINE, S.; WOOD, C. M. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). **Comp. Biochem. Physiol. C; Toxicol. Pharmacol.** v.147 , p.441–449, 2008.

FRANKLIN, L., E. Fertilization and the role of the acrosomal reaction in non-mammals. **Biol. Reprod. Suppl**. v.2, p.159–177, 1970

GAMBARDELLA, C.; ALUIGI, M.G.; FERRANDO, S.; GALLUS, L.; RAMOINO, P.; GATTI, A.M.; ROTTIGNI, M.; FALUGI, C. Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles. **Aquatic Toxicology.** v.130, n.131, p.77–85, 2013.

GAMBARDELLA, C.; FERRANDO, S.; GATTI, A. M.; CATALDI, E.; RAMONOIO, P.; ALUIGI, M. G.; FAIMALI, M.; DIASPRO, A.; FALUG, C. Review: Morphofunctional and biochemical markers of stress in sea urchin life stages exposed to engineered nanoparticles. **Environmental Toxicology.** v.31, p.1552-1562, 2016.

GAMBARDELLA, C.; FERRANDO, S.; MORGANA, S.; GALLUS, L.; RAMOINO, P.; RAVERA, S.; BRAMINI, M.; DIASPRO, A.; FAIMALI, M.; FALUGI, C. Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal bio-mineralization processes and larval plasticity. **Aquat Toxicol.** v.158, p.181-91, 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.014.

GALLO, A.; MANFRA, L.; BONI, R.; ROTINI, A.; MIGLIORE, L.; TOSTI, E. Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress. **Environ Int.** v.118, p.325-333, 2018. DOI: 10.1016/j.envint.2018.05.034. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29960187

GAMBOGI, J. USGS Mineral Commodity Summaries 2020, Titanium and Titanium Dioxide, p.174–177, 2020.

GIANGUZZA, P.; CHIANTORE, M. C.; BONAVIRIA, C.; CATTANEO-VIETTI, R.;VIELMINI, I.; RIGGIO, S. The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica island MPA (western Mediterranean, Italy). **Fish Res.** v.81, p.37–44, 2006.

GIUDICE, G. The Sea Urchin Embryo: A Developmental Biological System. **Springer Verlag**, Berlin Heidelberg. 1986.

GOPALAKRISHNAN, S.; THILAGAM, H. P.V. R. Toxicity of heavy metals on embryogenesis and larvae of the marine sedentary polychaete Hydroides elegans. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. v.52 , p.171–178, 2007.

GRAINGER, D. W.; CASTNER, D. G. Nanobiomaterials and nanoanalysis: opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. **Adv. Mater**. v.20, p.867–877, 2008.

GRAND VIEW RESEARCH. Titanium Dioxide Market Size, Share and Trends Analysis Report by Application, Region, and Segment Forecasts, pp. 2019–2025. https:// www.grandviewresearch.com/industry-analysis/titanium-dioxide-industry. 2019.

HAYDEN, E.C. Human genome at ten: life is complicated. **Nature.** v.464, p.664-667, 2010. DOI:10.1038/464664ª

HYMAN, L. H. **The invertebrates: Echinodermata, the coelomate Bilateria.** New York: McGraw-Hill Book Company, 1955.

HAYNES, V. N.; WARD, J. E.; RUSSELL, B. J.; AGRIOS, A. G. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms—current knowledge and suggestions for future research. **Aquat. Toxicol.** v.185, p.138–148, 2017. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.02.012

HAYNES, V. N.; WARD, J. E. The interactive effects of titanium dioxide nanoparticles and light on heterotrophic bacteria and microalgae associated with marine aggregates in nearshore waters. **Marine Environmental Research.** v.161, p.105146, 2020. DOI: 10.1016/j.marenvres.2020.105146.

HONG, F.; ZHOU, Y.; ZHAO, X.; SHENG, L.; WANG, L. Maternal exposure to nanosized titanium dioxide suppresses embryonic development in mice. **Inter. Jour. of Nanomedicine.** v.12, p.6197–6204, 2017.

HOU, W. C.; WESTERHOFF, P.; POSNER, J. D. Biological accumulation of engineered nanomaterials: a review of current knowledge. **Environ. Sci. Process. Impacts.** v.15, p.103–122, 2013.

HOSHINO, A.; FUJIOKA, K.; OKU, T.; SUGA, M.; SASAKI, Y. F.; OHTA, T. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. **Nano Lett.** v.4, p.2163–2169, 2004. DOI:10.1021/nl048715d.

HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; CAI, X. Effect of TiO_2 nanoparticle aggregation on marine microalgae *Isochrysis galbana*. **J. Environ. Sci.** v.66, p.208, 2018.

HUANG, M.; MA, Z.; KHOR, E.; LIM, L.Y. Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells. **Pharmacol. Res.** v.19, p.1488–1494, 2002.

ISPAS, C.; ANDREESCU, D.; PATEL, A.; GOIA, D.V.; ANDREESCU, S.; WALLACE, K.N. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in Zebrafish. **Environmental Science & Technology.** v.43, p.6349-6356, 2009.

JIANG, J. K.; 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. DOI:10.1007/s11051-008-9446-4.

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. DOI:https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.019.

JOVANOVIĆ, B. GUZMÁN, H. M. Effects of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles on caribbean reef-building coral (*Montastraea faveolata*). **Environ Toxicol Chem.** v.33, n.6, p.1346-53, 2014 DOI: 10.1002/etc.2560.

KLAINE, S. J.; ALVAREZ, P.J.; BATLEY, G. E.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R. D.; LYON, D. Y. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environ. Toxicol. Chem.** v.27, p.1825–1851, 2008.

LAPRAZ, F.; BESNARDEAU, L.; LEPAGE, T. Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. **PLoS Biol.** v.7, n.11, p.1000248, 2009. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000248.

LABILLE, J.; SLOMBERG, D.; CATALANO, R.; ROBERT, S.; APERS-TREMELO, M. L.; BOUDENNE, J. L.; MANASFI, T. R. O. Assessing UV filter inputs into beach waters during recreational activity: A field study of three French Mediterranean beaches from consumer survey to water analysis. **Sci Total Environ.** v.1, p.706. 2020. DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.136010. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31855634.

LEVINE, A. E.; WALSH, K. A.; FODOR, E. J. B. Evidence of an acrosin-like enzyme in sea urchin sperm. **Developmental Biology**, v.63(2), p.299–306, 1978.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A.; LEAD, J. R.; VALSAMI-JONES, E. Macromolecular Coronas and Their Importance in Nanotoxicology and Nanoecotoxicology, 1st Edn, Amsterdam: Elsevier Ltd. 2014.

MAGESKY, A.; PELLETIER, É. Toxicity mechanisms of ionic silver and polymer-coated silver nanoparticles with interactions of functionalized carbon nanotubes on early development stages of sea urchin. **Aquatic Toxicology.** v.167, p.106-123, 2015.

MAISANO, M.; CAPPELLO, T.; CATANESE, E.; VITALE, V.; NATALOTTO, A.; GIANNETTO, A.; BARRECA, D.; BRUNELLI, E.; MAUCERI, A.; FASULO, S. Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay. **Marine Environmental Research**. v.111, p.121-127, 2015.

MANNO, D.; SERRA, A.; BUCCOLIERI, A.; PANZARINI, E.; CARATA, E.; TENUZZO, B.; IZZO, D.; VERGALLO, C.; ROSSI, M.; DINI, L. Silver and carbon nanoparticles toxicity in sea urchin *Paracentrotus lividus*. **BioNanoMaterials**. v.14, p.229–238, 2013.

MANZO, S. Sea urchin embryotoxicity test: Proposal for a simplified bioassay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.57, p.123−128, 2004.

MANZO, S.; MIGLIETTA, M. L.; RAMETTA, G.; BUONO, S.; DI FRANCIA, G. Embryotoxicity and spermiotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Journal of Hazardous Materials**. v.254, n.255, p.1−9, 2013.

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. DOI:10.1016/j.marenvres.2018.02.012.

MARQUARDT, C.; FRITSCH-DECKER, S.; AL-RAWI, M.; DIABAT´E, S.; WEISS, C. Autophagy induced by silica nanoparticles protects RAW264. 7 macrophages from cell death. **Toxicology**. v.379, p.40–47, 2017.

MARTINO, C.; BONAVENTURA, R.; BYRNE, M.; ROCCHERI, M.; MATRANGA, V. Effects of exposure to gadolinium on the development of geographically and phylogenetically distant sea urchins species. **Mar. Environ. Res.** v.128, p.98–106, 2017.

MATRANGA, V. Echinodermata. In: Müller, W.E.G. (Ed.), Progress in Molecular and Subcellular Biology. **Springer, Berlin Heidelberg.** p.277, 2005.

MATRANGA, V.; BONAVENTURA, R.; COSTA, C.; KARAKOSTIS, K.; PINSINO, A.; RUSSO, R.; ZITO, F. Echinoderms as blueprints for biocalcification: regulation of skeletogenic genes and matrices. **Progress in Molecular and Subcellular Biology.** v.52, p.225-248, 2011.

MATRANGA, V.; CORSI, I. Toxic Effects of Engineered Nanoparticles in the Marine Environment: Model Organisms and Molecular Approaches. **Marine Environmental Research**. v.76, p.32-40, 2012.

McCOSHUM, S. M., SCHLARB, A. M. & BAUM, K. A. Direct and indirect effects of sunscreen exposure for reef biota. **Hydrobiologia.** v.776, p.1–8, 2016.

McDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Arch Pathol Lab Med.** v.100, p.405-414, 1976.

MEARNS, A.J.; REISH, D.J.; OSHIDA, P.S.; GINN, T.; REMPEL-HESTER, M.A.; ARTHUR, C.; RUTHERFORD, N. Effects of Pollution on Marine Organisms. **Water Enviroment Research.** v.106, p.1828-1933, 2013.

MESARIČ, T.; SEPČIĆ, K.; DROBNE, D.; MAKOVEC, D.; FAIMALI, M.; MORGANA, S.; FALUGI, C.; GAMBARDELLA, C. Sperm exposure to carbon-based nanomaterials causes abnormalities in early development of purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*). **Aquat. Toxicol.** v.163, p.158–166, 2015.

MILLER, R.J.; BENNETT, S. KELLER, A. A.; PEASE, S.; LENIHAN, H. S. TiO_2 Nanoparticles Are Phototoxic to Marine Phytoplankton. **PLoS ONE 7**. v.1, p.3032.1, 2012.

MINETTO, D.; LIBRALATO, G.; VOLPI GHIRARDINI, A. Ecotoxicity of engineered TiO_2 nanoparticles to saltwater organisms: An overview. **Environment International**. v.66, p.18-27, 2014.

MIRONAVA, T.; HADJIARGYROU, M.; SIMON, M.; JURUKOVSKI, V.; RAFAILOVICH, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. **Nanotoxicology**. v.4, p.120–37, 2010.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**. v.32, p.967−976, 2006.

MORRISON, I, D.; ROSS, S. Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams. Wiley-Interscience, New York. 2002.

MORRONI, L.; PINSINO, A.; PELLEGRINI, D.; REGOLI, F.; MATRANGA, V. Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. **Ecotoxicol Environ Saf.** v.123, p.2–7, 2016.

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.

MOURDIKOUDIS, 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.

NAASZ, S.; ALTENBURGER, R.; KÜHNEL, D. Environmental mixtures of nanomaterials and chemicals: the Trojan-horse phenomenon and its relevance for ecotoxicity. **Sci. Total Environ.** v.635, p.1170–1181, 2018.

NANDAN, S.B; NIMILA, P. J. Lindane toxicity: Histopathological, behavioural and biochemical changes in *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795). **Marine Environmental Research**. v.76, p.63–70, 2012.

NASSER, F.; CONSTANTINOU, J.; LYNCH, I. Nanomaterials in the Environment Acquire an "Eco-Corona" Impacting their Toxicity to *Daphnia Magna* – a Call for Updating Toxicity Testing Policies. **Proteomics**, v. 20, p.1800412, 2019.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel, **Science**. v. 311, p.622–627, 2006.

NOGUEIRA, V.; LOPES, I.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; RASTEIRO, M. G.; ABRANTES, N.; GONÇALVES, F.; SOARES, A. M. V. M.; DUARTE, A. C.; PEREIRA, R. Assessing the

ecotoxicity of metal nano-oxides with potential for wastewater treatment. **Environ. Sci. Pollut. Res.** v.22, p.13212-13224, 2015.

NOVELLI, A. A.; LOSSO, C.; GHETTI, P. F.; GHIRARDINI A. V. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the lagoon of Venice, Italy. **Environ. Toxicol. Chem.** v.22. p.1295–1301, 2003.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution** v.150, p.5-22, 2007.

NOWACK, B.; MITRANO, D. M. Procedures for the production and use of synthetically aged and product released nanomaterials for further environmental and ecotoxicity testing. **Nanoimpact.** v.10, p.70–80, 2018. DOI: 10.1016/j.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspective.** v.113, p.823-839, 2005.

OECD, 2009. Nanotechnology: an Overview Based on Indicators and Statistics (DSTI/DOC(2009)7eJT03267289).

OLIVIERO, M.; SCHIAVO, S.; DUMONTET, S.; MANZO, S. DNA damages and offspring quality in sea urchin *Paracentrotus lividus* sperms exposed to ZnO nanoparticles. **Science of the Total Environment.** v.651, p.756–765, 2019.

PEARSE, J. S. Ecological role of purple sea urchins. **Science** (New York, N.Y.), v.314, p.940–941, 2006.

PEDATA, P.; RICCI, G.; MALORNI, L.; VENEZIA, A.; CAMMAROTA, M.; VOLPE, M.G.; IANNACCONE, N.; GUIDA, V.; SCHIRALDI, C.; ROMANO, M.; IACOMINO, G. *In vitro* intestinal epithelium responses to titanium dioxide nanoparticles. **Food Res. Int.** v.119, p.634–642, 2019.

PICCHIETTI, S.; BERNINI, C.; STOCCHI, V.; TADDEI, A. R.; MESCHINI, R.; FAUSTO, A. M.; SCAPIGLIATI, G. Engineered nanoparticles of titanium dioxide (TiO_2): Uptake and biological effects in a sea bass cell line. **Fish & Shellfish Immunology.** v.63, p.53–67, 2017. DOI:10.1016/j.fsi.2017.01.044.

PIKULA, K.; ZAKHARENKO, A.; CHAIKA, V.; EM, I.; NIKITINA, A.; AVTOMONOV, E.; TREGUBENKO, A.; AGOSHKOV, A.; MISHAKOV, I.; KUZNETSOV, V.; GUSEV, A.; PARK, S.; GOLOKHVAST, K. Toxicity of Carbon, Silicon, and Metal-Based Nanoparticles to Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. **Nanomaterials.** v.10, p.1825, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/nano10091825.

PINSINO, A.; BERGAMI, E.; TORRE, C. D.; VANNUCCINI, M. L.; ADDIS, P.; SECCI, M.; DAWSON, K. A.; MATRANGA, V.; CORSI, I. Amino-modified polystyrene nanoparticles affect

signalling pathways of the sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. **Nanotoxicology**, v.11, n.2, p.201-209, 2017.

PINSINO, A.; RUSSO, R.; BONAVENTURA, R.; BRUNELLI, A.; MARCOMINI, A.; MATRANGA, V. Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signalling pathway. **Scientific Reports.** v.5, n.14492, 2015.

PRAETORIUS, A.; BADETTI, E.; BRUNELLI, A.; CLAVIER, A.; GALLEGO-URREA, J. A.; GONDIKAS, A. Strategies for determining heteroaggregation attachment efficiencies of engineered nanoparticles in aquatic environments. **Environ. Sci. Nano.** v.7, p.351–367, 2020. DOI: 10.1039/c9en01016e.

RAST, J. P.; SMITH, L. C.; LOZA-COLL, M.; HIBINO, T.; LITMAN, G. W. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. **Science,** v.314, p.952–956, 2006.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

ROBICHAUD, C. O.; UYAR, A. E.; DARBY, M. R.; ZUCKER, L. G.; WIESNER, M. R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO_2 production as a basis for exposure assessment. **Environmental Science & Technology.** v.43, p.4227–4233, 2009.

SEA URCHIN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Science**, v.314, p.941–952, 2006. DOI: 10.1126/science.1133609.

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: A review. **Journal of King Saud University.** 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2017.06.012.

SOARS, N. PROWSE, T; BYRNE, M. Overview of phenotypic plasticity in echinoid larvae, ‘Echinopluteus transversus’ type vs. typical echinoplutei. **Mar Ecol Prog Ser** v.25, p.383-113, 2009.

STOLPE, B.; HASSELLOV, M. Changes in size distribution of fresh water nanoscale colloidal matter and associated elements on mixing in seawater. **Geochimica and Cosmochimica Acta.** v.71, p.3292-3301. 2007

STONE, V.; NOWACK, B.; BAUN, A.; VAN DEN BRINK, N.; VON DER KAMMER, F.; DUSINSKA, M.; HANDY, R.; HANKIN, S.; HASSELLÖV, M.; JONER, E.; FERNANDES, T. F. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. **Sci. Total Environ.** v.408, p.1745–1754, 2010.

SUN, J.; GUO, L.H.; ZHANG, H.; ZHAO, L. UV irradiation induced transformation of TiO2 nanoparticles in water: aggregation and photoreactivity. **Environ. Sci. Technol**. v.48, p.11962–11968, 2014.

TAN, C.; FAN, W.; WANG, W. Role of titanium dioxide nanoparticles in the elevated uptake and retention of cadmium and zinc in Daphnia magna. Environ. Sci. Technol. v.42, p.469–476, 2012.

TIAN, S.; ZHANG, Y.; SONG, C.; ZHU, X.; XING, B. Titanium dioxide nanoparticles as carrier facilitate bioaccumulation of phenanthrene in marine bivalve, ark shell (*Scapharca subcrenata*). **Environ. Pollut. v.**192, p.59–64, 2014.

TORRES-DUARTE, C.; ADELEYE, A.S.; POKHREL, S.; MÄDLER, L.; KELLER, A.A.; CHERR, G.N. Developmental effects of two different copper oxide nanomaterials in sea urchin (*Lytechinus pictus*) embryos. **Nanotoxicology**. v.10, n.6, p.671-679, 2015.

VANCE, M. E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E. P.; MCGINNIS, S. P.; HOCHELLA, M. F. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein J. Nanotechnol.** v.6, p.1769–1780, 2015. DOI: 10.3762/bjnano.6.181.

VIELMINI, I.; RIGGIO, S. The effects of recreational *Paracentrotus lividus* fishing on distribution patterns of sea urchins at Ustica island MPA (western Mediterranean, Italy). **Fish Res.** v.81, p.37–44, 2006.

VOLPI GHIRARDINI, A.; LOSSO, C.; ARIZZI NOVELLI, A.; HIS, E.; GHETTI, P. E. *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). **Journal of Chemical Ecology.** v.21, p.455-463, 2005.

WEIR, A.; PAUL, W.; LARS, F.; KIRIL, H.; NATALIE, V.G. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. Environ. Sci. Technol. 46, 2242–2250. 2012.

WU, B.; TORRES-DUARTE, C.; COLE, B. J.; CHERR, G. N. Copper Oxide and Zinc Oxide Nanomaterials Act as Inhibitors of Multidrug Resistance Transport in Sea Urchin Embryos: Their Role as Chemosensitizers. **Environ. Sci. Technol**. v.49, p.5760– 5770, 2015.

XIONG, D.; FANG, T.; YU, L.; XIAOFENG, S.; WENTAO, Z. Effects of nano-scale TiO2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Science of the Total Environment**. v.409, n.8, p.1444–1452, 2011.

ZARE, Y. Study of nanoparticles aggregation/agglomeration in polymer particulate nanocomposites by mechanical properties. **Compos A: Appl. Sci. Manuf.** v.84, p.158–164, 2016.