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

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

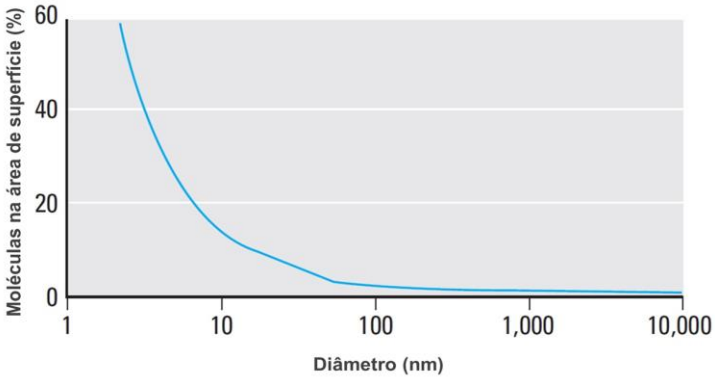
1 INTRODUÇÃO

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 ($PS-NH_2$) 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)

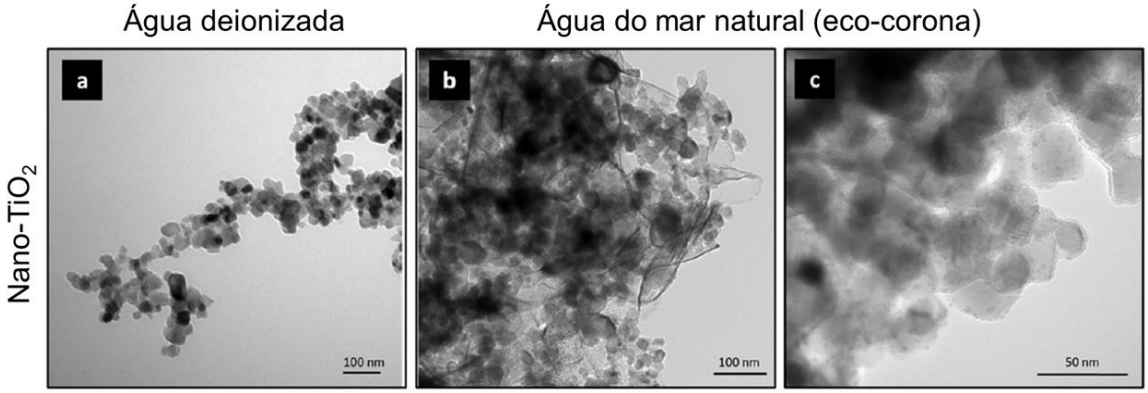
Por apresentarem propriedades fotocatalíticas, as nano-TiO_2 são utilizadas, ainda, para tratamento de esgoto, pois na presença de luz UV, tais NPs são capazes de danificar as membranas celulares e o DNA de bactérias presentes nas águas residuais; fato, este, que ocorre, devido à formação de espécies 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.

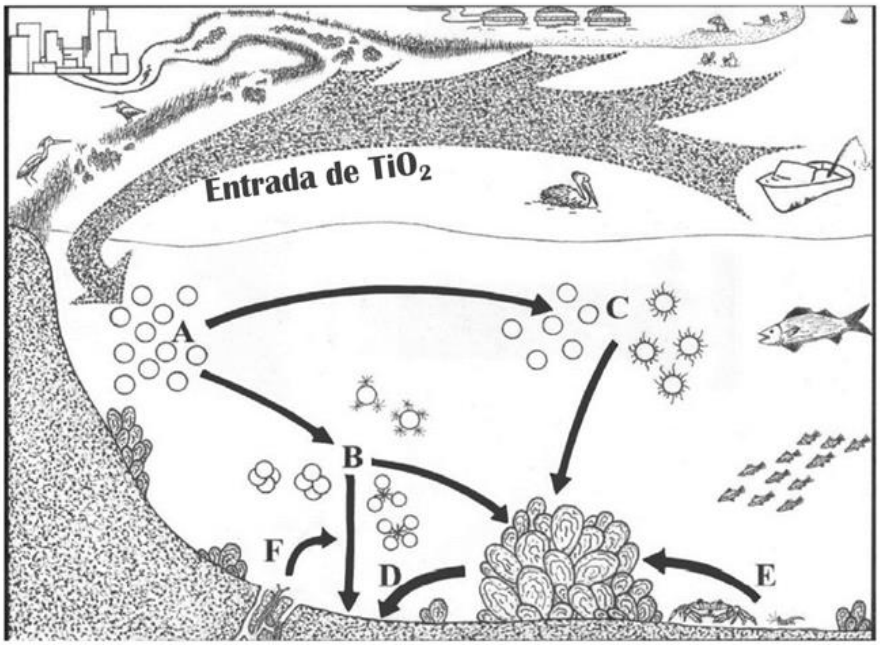
O efeito das nano-TiO_2 também tem sido estudo em outros modelos biológicos, como no desenvolvimento embrionário de ratos (HONG *et al*., 2017), cultura de células do epitélio intestinal (PEDATA *et al*., 2019), e na expressão de microRNA de plantas (Boykov*;* Shuford; Zhang, 2019). Que evidencia esta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

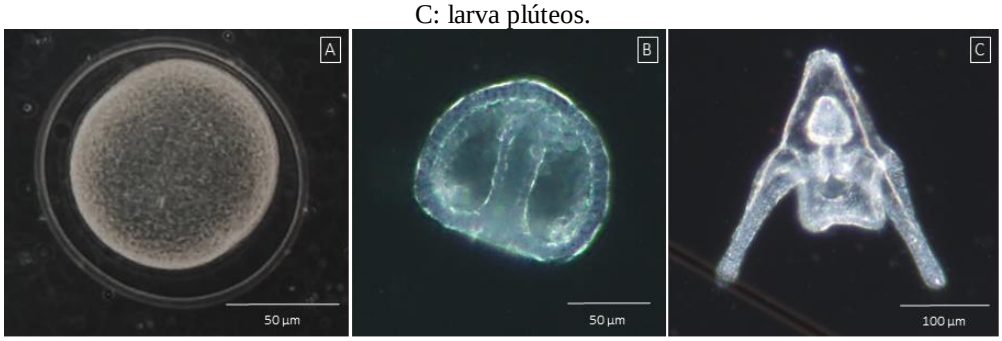
Os ouriços-do-mar possuem mecanismos moleculares que vão atuar de maneira basal para o correto desenvolvimento e formação do embrião, entretanto, a ativação excessiva destes em função de diversos estressores gera um alto custo energético, que por sua vez,

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).

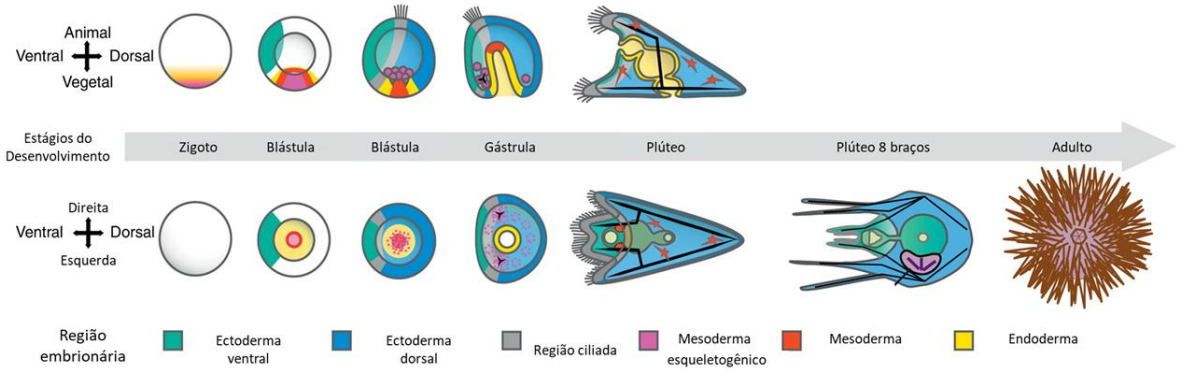
Realizar ensaios sobre a fertilização e o desenvolvimento traz a perspectiva de comparar os efeitos da mesma substância em dois sistemas biológicos diferentes: espermatozoides e embriões. Os espermatozoides são células únicas, altamente especializadas e, quando interagem com substâncias tóxicas, podem 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 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.