



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade
no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*)

FRANCINE GIRARDELLO

Caxias do Sul
2016

FRANCINE GIRARDELLO

**Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade no
mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção do grau de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Andreia Neves Fernandes (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador (UCS)

Caxias do Sul, 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

G519n Girardello, Francine, 1984-
Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) / Francine Girardello. – 2016.
100 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques ; Coorientadores: Profa. Dra. Andreia Neves Fernandes, Profa. Dra. Mirian Salvador.

1. Nanotecnologia. 2. Mexilhão dourado. 3. Toxicologia ambiental.
4. Monitoramento biológico. I. Título.

CDU 2. ed.: 620.3

Índice para o catálogo sistemático:

1. Nanotecnologia	620.3
2. Mexilhão dourado	594.141
3. Toxicologia ambiental	615.9
4. Monitoramento biológico	632.937

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

FRANCINE GIRARDELLO

**Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade no mexilhão
dourado (*Limnoperna fortunei*)**

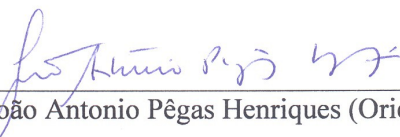
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

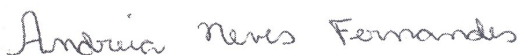
Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Andreia Neves Fernandes

Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador

TESE APROVADA EM 23 DE MAIO DE 2016



Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques (Orientador)



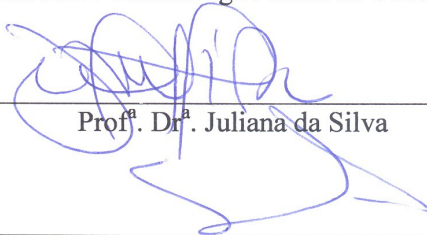
Prof^a. Dr^a. Andreia Neves Fernandes (Co-orientadora)



Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador (Co-orientadora)



Prof^a. Dr^a. Temenouga Nikolova Guecheva



Prof^a. Dr^a. Juliana da Silva

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

“Seja bom ou ruim... tudo passa.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo;

Ao meu amor Fábio, pelo companheirismo, amor, compreensão e paciência. Por acreditar em mim e me apoiar. Por me dar o maior amor do mundo, o nosso Enrico!

Aos meus pais, Alceu e Rose, pela educação, amor e segurança que me passaram; vocês são meu porto seguro;

Aos meus irmãos e aos queridos “anexos” da família: Fabiano, Daiane, Karine, pelo carinho e apoio; ao Miguel, um amorzinho que só de olhar pra ele já me transmitia leveza e tranquilidade;

Ao meu orientador Professor Henriques, que me aceitou como aluna e acreditou em mim; sua sabedoria e seus conhecimentos eu levarei para sempre. Um profissional excelente e humano, que muitas vezes me dizia para ficar calma e fazia-me acreditar que ia dar certo. Obrigada. Tenho muito orgulho de ter trabalhado com você Henriques!

A minha co-orientadora Professora Andreia, que me aceitou novamente como aluna, desta vez no doutorado, pelo apoio e confiança, pelas incansáveis explicações seja na UFRGS, seja pelo telefone, de noite ou finais de semana; agradeço pelos diversos pousos e pela sua amizade. Além de tudo, trabalhar com você me fez ganhar uma amiga!

A minha co-orientadora Professora Mirian, por ter me aceito como aluna, pelo conhecimento transmitido, por disponibilizar o laboratório quando precisei e pelas diversas contribuições durante o doutorado. Sua inteligência e sabedoria engrandeceram muito este trabalho;

A Professora Mariana, pelas inúmeras colaborações durante o desenvolvimento do trabalho, pelo auxílio nas vezes em que precisei, pela sua atenção e disponibilidade sempre; foi muito bom conviver e aprender com você;

As colaboradoras Izabel e Miriana pelo incentivo e colaboração de vocês; duas pessoas maravilhosas as quais tenho muito a agradecer. Izabel, obrigada pelas vezes em que me acompanhou e auxiliou nas coletas e manutenção dos mexilhões. Sua experiência ajudou na consolidação da minha;

A minha IC Camila pela sua indispensável ajuda, colaboração e dedicação. Foram madrugadas e finais de semana realizando experimentos (nas férias inclusive!). Obrigada!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo conhecimento e experiências transmitidos;

Aos membros da banca de acompanhamento, professor Sidnei e professora Mariana, pelas colaborações e aos ensinamentos durante o desenvolvimento da tese;

As minhas amigas de São Marcos que depositaram confiança em mim, sempre me incentivaram, escutaram minhas lamentações... Vocês me impulsionaram.

As minhas amigas e colegas do laboratório pela parceria e amizade; pela troca de ensinamentos; pelas experiências vividas. Eu adorei conhecer e conviver com vocês. Quero que nossa amizade permaneça para sempre;

A Universidade de Caxias do Sul onde foi possível o desenvolvimento do trabalho e aquisição do conhecimento;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

Muito obrigada a todos que me fizeram acreditar que isso tudo podia dar certo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xv
INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	xvii
ESTRUTURA DA TESE	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Nanotecnologia e Nanopartículas de dióxido de titânio	25
1.2 Toxicidade e Biomonitoramento	29
1.3 Mexilhão dourado (<i>Limnoperna fortunei</i>).....	33
1.4 Genotoxicidade e Mutagenicidade	37
1.5 Estresse Oxidativo e Defesas antioxidantes	42
2. OBJETIVOS	52
2.1 OBJETIVO GERAL.....	52
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
CAPÍTULO 1	55
CAPÍTULO 2	64

3.	DISCUSSÃO GERAL.....	74
4.	CONCLUSÕES.....	83
5.	PERSPECTIVAS	86
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
7.	ANEXO	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação diagramática de exemplos relacionados com partículas na escala nanométrica (1 nm = 0,000 000 001 m). Fonte: adaptado de <http://portal.anvisa.gov.br>. 26
- Figura 2.** Representação das possíveis transformações físicas e químicas das NP presentes no ambiente aquático. As NP podem entrar através de efluentes, deposição pelo ar e liberação direta. No compartimento aquático podem ocorrer as seguintes transformações: dissolução, agregação e sedimentação. Essas transformações são dependentes das propriedades físico-químicas tanto das NP quanto do ambiente no qual foram liberadas. As NP podem interagir com cátions e ânions, matéria orgânica e superfícies minerais. Fonte: adaptado de Vale et al. (2016). 30
- Figura 3.** Esquema ilustrativo das possíveis interações e destino das NP no ambiente aquático e os processos biológicos associados com moluscos bivalves. No meio aquático, os animais podem interagir com as NP nas suas formas: individual, com os seus íons liberados, agregadas, estabilizadas por matéria orgânica natural (MON), adsorvidas por algas e/ou outros poluentes. Podem ocorrer a bioacumulação e a sedimentação das NP, podendo ser ressuspensas na água. A biomagnificação pode ocorrer atingindo os demais níveis tróficos. Fonte: adaptado de Rocha et al. (2015). 33
- Figura 4.** Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). Fonte: Francine Girardello. 35

Figura 5. Local de coleta do mexilhão dourado, na Região Hidrográfica do Lago do Guaíba, em Itapuã, no município de Viamão, no Rio Grande do Sul.	35
Figura 6. Fragmentos do DNA danificado migram para fora do núcleo formando uma cauda que lembra a forma de um cometa. O tamanho, formato e intensidade da cauda estão relacionados com o nível de dano no DNA da célula. A imagem apresenta os fragmentos de DNA dos hemócitos do <i>Limnoperna fortunei</i> , utilizados no presente trabalho. Fonte: Francine Girardello.....	38
Figura 7. Danos no DNA. Danos recentes são passíveis de reparo e se referem à genotoxicidade avaliada, enquanto que os danos irreparáveis permanecem no material genético e podem levar a mutações, acarretando mutagenicidade, podendo induzir ou promover a carcinogênese celular.	40
Figura 8. Formação do micronúcleo na célula.	41
Figura 9. Ação da enzima superóxido dismutase na degradação de $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2	43
Figura 10. Ação da enzima catalase na degradação de H_2O_2 , gerando H_2O e O_2	43
Figura 11. Geração de ERO e defesas antioxidantes enzimáticas. Elétrons podem reagir com o O_2 formando $O_2^{\cdot-}$. A enzima antioxidante Sod dismuta o $O_2^{\cdot-}$ gerando H_2O_2 o qual, por sua vez, pode ser decomposto pela enzima GPx ou pela enzima Cat a H_2O e O_2 . Alternativamente, o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com metais de transição como o Fe^{2+} formando HO^{\cdot} (Halliwell e Gutteridge, 2015).	44

Figura 12. Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Adaptado de Carochó e Ferreira (2013).....	45
Figura 13. Representação das possíveis rotas para a geração de ERO na presença de NP. (1) Internalização poderia gerar ERO devido à dissolução das NP nas células e/ou à atividade fotocatalítica das NP. (2) Dissolução das NP levaria ao aumento na concentração de íons metálicos (M) no meio, podendo alguns desses metais serem capturados pelos organismos. (3) NP podem adsorver/complexar outros metais presentes no meio, podendo ser tomados pelas células. (4) Atividade fotocatalítica das NP na presença da radiação ultravioleta e/ou luz natural. Fonte: adaptado de Vale et al., (2016).....	49

CAPÍTULO 1

Figure 1. Transmission electron microscopic (TEM) of TiO ₂ -NP powder. Media dimension of nanoparticles are of about 20 nm. Arrow points to a TiO ₂ -NP.....	59
Figure 2. X-ray diffraction (XDR) pattern of TiO ₂ -NP; the crystalline phases are anatase (A) and rutile (R).....	60
Figure 3. Genotoxicity of TiO ₂ -NP in haemolymph cells (2 and 4 h exposition assays). Comet assay: Percentage of tail DNA (A) and Olive tail moment (B)	

statistical difference ($*p < 0.01$). Comparing the two exposition times to each concentration was obtained statistical difference ($\#p < 0.01$). 60

Figure 4. Mutagenicity of TiO₂-NP in haemolymph cells (24 h exposition assays). The bars represent the micronucleus frequency on mononuclear cells. The controls refer to the same time exposition of the assays, 24 h..... 61

CAPÍTULO 2

Figure 1. TEM images of *L. fortunei* haemocytes. A: Non-treated samples - control (nu: nucleus). B: TiO₂-NP is phagocytized by haemocytes (1 µg mL⁻¹, 2h). C: close contact of TiO₂-NP with cell surface membrane and internalized by haemocytes (50 µg mL⁻¹, 2h). D: TiO₂-NP inside the autophagosomes (at) (50 µg mL⁻¹, 2h). E: low TiO₂-NP concentration in haemocytes showing no morphological alterations (1 µg mL⁻¹, 4h). F: high TiO₂-NP concentration and its aggregates (arrows) were in haemocytes; the cells are damaged and no organelles or membranes are visible (50 µg mL⁻¹, 4h).. 69

Figure 2. EDS elemental analysis confirming the presence of titanium in treated sample (50 µg mL⁻¹, 2h), peaks are indicated with arrows. The remaining peaks in figure refer to the presence of others metals as Cu, Os and Pb. 70

Figure 3. Illustrative scheme demonstrating the possible molecular mechanisms that can act on *Limnoperna fortunei* cells after TiO₂-NP exposure. TiO₂-NP can be phagocyte and release into the cytosol. TiO₂-NP penetrates, generate ROS and induce oxidative stress, which may be inhibited by the

induction of enzymatic antioxidant defenses by SOD, CAT, and non-enzymatic antioxidant defense by sulfhydryl protein content. The TiO₂-NP can also induce lipid peroxidation damaging to the outer cell membrane (Girardello et al., 2016a). Autophagosomes with TiO₂-NP within of the cell possible appears as a response to the internalization of these nanoparticles and induce cell death. As a consequence, TiO₂-NP can cause DNA damage directly or indirectly through the induction of oxidative stress, as described by Girardello et al, (2016a). 71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Table 1.** Physical–chemical parameters of Itapuã water..... 60
- Table 2.** Physical–chemical characteristics of solutions in different TiO₂-NP concentrations. 60
- Table 3.** Evaluation of oxidative damage to lipids and proteins in golden mussel’s soft body in different exposition times and TiO₂-NP concentrations. 61

CAPÍTULO 2

- Table 1.** Sod and Cat activities of golden mussel’s soft body in different exposure times and TiO₂-NP concentrations. 68
- Table 2.** Determination of sulfhydryl protein content (non-enzymatic antioxidant defense) in golden mussel’s soft body in different exposure times and TiO₂-NP concentrations. 70

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
BET	método de Brunauer-Emmett-Teller
Cat	catalase
DLS	espalhamento dinâmico de luz (dynamic light scattering)
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DRX	difração de raios X
DTNB	5,5'-ditiobis (2-acido nitrobenzoico)
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutathiona peroxidase
GSH	glutathiona
HO \cdot	radical hidroxila
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (International Agency for Research on Cancer)
ind	indivíduo
MDA	malondialdeído
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MN	micronúcleos
MON	matéria orgânica natural

nm	nanômetro
NP	nanopartículas
$O_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
SH	grupamento sulfidril
Sod	superóxido dismutase
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TiO ₂ -NP	nanopartículas de TiO ₂
TNB	2-nitro-5- ácido tiobenzoico

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido principalmente nas instalações do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, situado no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Parte das atividades experimentais foi realizada no Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, situado no mesmo instituto. Este trabalho foi subsidiado pela FAPERGS/CAPES, a qual concedeu a bolsa de doutorado através do Programa de Bolsas de Doutorado, Edital FAPERGS/CAPES 010/2011.

ESTRUTURA DA TESE

A presente tese está estruturada da seguinte forma: introdução geral, objetivos do trabalho (geral e específicos), capítulo 1 correspondente à avaliação genotóxica, mutagênica e de estresse oxidativo TiO₂-NP na hemolinfa do *Limnoperna fortunei* e capítulo 2 referente à análise da internalização e localização das TiO₂-NP nos hemócitos do mexilhão dourado e avaliação das defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas neste organismo. Uma discussão geral do trabalho é apresentada, seguida das conclusões obtidas, perspectivas e referências bibliográficas. O Currículo Lattes encontra-se em anexo.

A introdução da tese apresenta generalidades sobre nanopartículas, em especial as TiO₂-NP, riscos da sua exposição e liberação no meio ambiente, biomonitoramento através de organismos aquáticos, destacando a utilização do mexilhão dourado *L. fortunei*, ensaios de avaliação da toxicidade das TiO₂-NP e a utilização do organismo como biomonitor dessa exposição.

O Capítulo 1 apresenta o trabalho publicado na revista “Aquatic Toxicology”, o qual abordou os efeitos genotóxicos, mutagênicos e de estresse oxidativo das TiO₂-NP, utilizando o ensaio cometa, teste de micronúcleos, além das análises de danos oxidativos a lipídios e proteínas. Este trabalho também conta com uma ampla caracterização das TiO₂-NP, a qual possibilita discutir satisfatoriamente os resultados encontrados nos ensaios.

O Capítulo 2 se refere ao artigo publicado na revista “Aquatic Toxicology”, o qual mostra a internalização e a localização das TiO₂-NP nos hemócitos do mexilhão

dourado e os resultados referentes às defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas do *L. fortunei* exposto às TiO₂-NP.

A discussão geral aborda os resultados dos dois capítulos apresentados, a relação entre os mesmos e a importância desse estudo como contribuição científica. Por fim, é apresentada a conclusão final do trabalho desenvolvido, as suas perspectivas e o anexo contendo o Currículo Lattes.

RESUMO

A nanotecnologia é uma das áreas de maior desenvolvimento da atualidade. Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP) têm sido amplamente utilizadas em diversos produtos e processos nos últimos anos. Como consequência, estas nanopartículas são liberadas em efluentes e águas residuais, atingindo os compartimentos aquáticos. Com isso, a avaliação do impacto biológico das TiO₂-NP se torna de grande importância na área de ecotoxicidade. O mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) é um molusco bivalve de água doce muito utilizado no biomonitoramento ambiental, considerado organismo alvo para toxicidade de TiO₂-NP no ambiente aquático. Neste trabalho, os exemplares do *L. fortunei* foram expostos às TiO₂-NP (1, 5, 10 e 50 µg mL⁻¹), as quais foram previamente caracterizadas físico-quimicamente. A avaliação toxicológica se deu através do ensaio cometa, teste de micronúcleos, avaliação dos danos oxidativo a lipídios e proteínas e avaliação das defesas antioxidantes através da atividade das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat) e do conteúdo sulfidril de proteínas. A interação de TiO₂-NP com os hemócitos do mexilhão dourado foi avaliada utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados mostraram que as TiO₂-NP apresentaram tamanho médio de cerca de 20 nm e são compostas pelas estruturas cristalinas anatase e rutilo, com área superficial de 46,26 m² g⁻¹. As soluções de 1, 5, 10 e 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP utilizadas apresentaram baixa estabilidade com tendência à formação de agregados. A genotoxicidade das TiO₂-NP foi evidenciada pelos danos ao DNA do *L. fortunei* verificados após 2 h de exposição e aumentada após 4 h para todas as concentrações testadas. TiO₂-NP não foram capazes de induzir a formação de micronúcleos nos hemócitos do mexilhão dourado. Os mexilhões apresentaram aumento nos níveis de

peroxidação lipídica e do conteúdo de proteínas carboniladas após 2 h de exposição às concentrações de TiO₂-NP utilizadas. Após 4 h de exposição, esses valores não apresentaram diferença do controle. A atividade da enzima Sod foi diminuída após 2 h de exposição para todas as concentrações testadas de TiO₂-NP. A enzima Cat apresentou diminuição na atividade após 2 h de exposição dos mexilhões às concentrações de 10 e 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP. As defesas antioxidantes não enzimáticas foram diminuídas após 2 h de exposição dos mexilhões a todas as concentrações de TiO₂-NP utilizadas. Após 4 h de exposição, tanto as defesas antioxidantes enzimáticas como as não enzimáticas foram restauradas. Conforme análise das imagens de MET, TiO₂-NP foram internalizadas nos hemócitos do mexilhão dourado, ocasionando alterações na estrutura da membrana plasmática. As TiO₂-NP causaram efeitos toxicológicos no mexilhão dourado, capazes de causar genotoxicidade e alterações no metabolismo redox nas células dos animais. Estes resultados reforçam os cuidados que devem ser aplicados na liberação das TiO₂-NP no ambiente, devido a problemas causados pela exposição às nanopartículas. Além disso, os dados apresentados demonstram o potencial do *L. fortunei* como organismo biomonitor para a exposição às nanopartículas.

Palavras-chave: nanopartículas de dióxido de titânio, *Limnoperna fortunei*, genotoxicidade, estresse oxidativo, biomonitoramento

ABSTRACT

Nanotechnology is one of the fastest-growing areas of the actuality. Nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂-NP) have been widely used in many products and processes in recent years. As consequence, these nanoparticles are release into effluent and wastewater, reaching water compartments. Thus, the evaluation of the biological impact of TiO₂-NP becomes of great importance for ecotoxicity. The golden mussel (*Limnoperna fortunei*) is a freshwater bivalve mollusk often used in biomonitoring, considered target organism for TiO₂-NP toxicity in the aquatic environment. In this work, *L. fortunei* were exposed to TiO₂-NP (1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹), which were previously physic-chemically characterized. The toxicological evaluation was performed using the comet assay, micronucleus test, evaluation of oxidative damage to lipids and proteins, assessment of antioxidant defences through the activity of the enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) and the protein sulfhydryl content. The TiO₂-NP interaction with the haemocytes of golden mussel was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). The results showed that TiO₂-NP presented average size about 20nm, composed of the anatase and rutile crystalline structures, with surface area of 46.26 m² g⁻¹. The TiO₂-NP solutions of 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ used showed low stability with a tendency to form aggregates. The genotoxicity of TiO₂-NP was evidenced by DNA damage of *L. fortunei* after 2 h of exposure and increased after 4 h for all concentrations tested. TiO₂-NP was not able to induce micronucleus in haemocytes of golden mussels. The mussels showed an increase in lipid peroxidation levels and carbonylated proteins content after 2 h of exposure to the concentrations of TiO₂-NP used. After 4 h of exposure, these values showed no difference compared to control. Sod enzyme activity was decreased after 2 h of

exposure for all tested concentrations of TiO₂-NP. Cat enzyme activity decreased after 2 h of exposure of the mussels to concentrations of 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP. The non-enzymatic antioxidant defences decreased after 2 h of mussels exposure of all TiO₂-NP concentrations used. The mussels showed increased levels of lipid peroxidation and carbonyl proteins after 2 h of exposure to TiO₂-NP, showing no similar effects after 4 h of exposure. The enzymatic and non-enzymatic antioxidants defences were depleted after 2 h of TiO₂-NP exposure to the mussels. After 4 h of exposure, both enzymatic antioxidant and non-enzymatic defences were restored. As shown by the TEM image analysis, TiO₂-NP was internalized by haemocytes of the golden mussel, causing changes in plasmatic membrane structure. The TiO₂-NP cause toxicological effects on the golden mussel, which are able to cause genotoxicity and changes in redox metabolism of cells. These results reinforce the care that must be applied to the release of TiO₂-NP in the environment due to problems caused by nanoparticles exposure. Furthermore, the data presented demonstrate the potential *L. fortunei* as biomonitor organism for exposure to nanoparticles.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles, *Limnoperna fortunei*, genotoxicity, oxidative stress, biomonitoring

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e Nanopartículas de dióxido de titânio

A nanotecnologia tem sido um dos principais focos de pesquisa da atualidade por desenvolver técnicas, processos e produtos que se utilizam de partículas em escala nanométrica (1 a 100 nm) (Figura 1), oferecendo a habilidade de controlar a matéria nessa escala e criar materiais com propriedades e funções específicas (Yunus et al., 2012). A nanotecnologia está associada ao desenvolvimento do setor econômico de cada país, com produtos e processos inovadores e conteúdo tecnológico avançado. Diferentes nanopartículas (NP) são produzidas e utilizadas industrialmente, como por exemplo: de ouro, prata, ferro, óxido de zinco (ZnO), nanotubos de carbono, óxido de cobre (CuO) e dióxido de titânio (TiO₂). A nanotecnologia engloba muitas áreas de diversos segmentos e setores industriais, como a indústria farmacêutica, cerâmica, alimentícia, eletrônica, cosmética, área médica, biotecnológica, entre outras (para revisão, ver Shi et al., 2013; Simonet e Valcárcel, 2009).

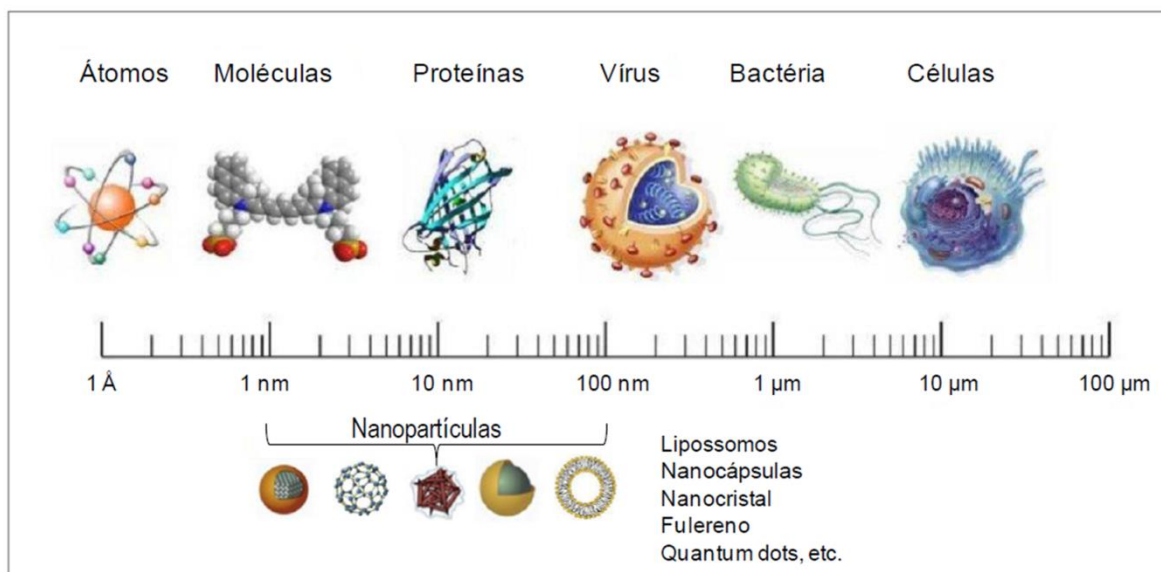


Figura 1. Representação diagramática de exemplos relacionados com partículas na escala nanométrica (1 nm = 0,000 000 001 m). Fonte: adaptado de <http://portal.anvisa.gov.br>.

O avanço da ciência e da tecnologia que utilizam estruturas nanométricas na composição ou formulação de produtos, busca a obtenção de melhores propriedades de seus materiais, tornando suas características mais atrativas. Com dimensões de até 100 nm, as NP apresentam grande área superficial e volume reduzido, implicando em um grande potencial de ação e reatividade. Essas características fazem com que as NP comportem-se de maneira muito diferente ao mesmo material em escalas maiores, conferindo-lhes distintas propriedades físicas, químicas e biológicas (Elsaesser e Howard, 2012; Oberdorster et al., 2005). Essas propriedades, afetadas pelo pequeno tamanho das partículas, irão determinar seu comportamento, efeitos biológicos e, consequentemente, sua toxicidade (Rocha et al., 2015).

As características físicas e químicas das NP podem ser avaliadas por técnicas que possibilitam mensurar o tamanho das estruturas, analisar a morfologia

apresentada, mensurar a área superficial correspondente, assim como identificar a estrutura cristalina na qual se apresentam. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite a análise por imagem das características morfológicas e de tamanho apresentado pelas NP. A obtenção das imagens por MET ocorre quando o feixe de elétrons atravessa uma amostra fina e os feixes transmitidos e difratados são detectados. A área superficial específica de NP está relacionada com sua toxicidade biológica e pode ser avaliada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), o qual descreve, a partir de uma teoria matemática, a adsorção física de moléculas de gás sobre uma superfície. A determinação da estrutura cristalina dos materiais envolve a utilização de técnicas de difração, como a difração de raios X (DRX), que auxiliam na determinação das propriedades das NP. Para a caracterização de uma solução contendo NP, podem ser empregadas técnicas como a de espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*), possibilitando a análise da distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas, e potencial Zeta (ζ), o qual mensura a carga elétrica das NP fornecendo informações sobre a sua estabilidade no sistema. A caracterização adequada fornece informações importantes que podem estar associadas com o comportamento das NP e suas interações com o meio em que se encontram (Adam et al., 2016; Girardello et al., 2016a; Girardello et al., 2016b).

A grande produção de partículas em escala nanométrica, que a princípio visa a obtenção de benefícios aos seus usuários, traz concomitantemente, a preocupação sobre os efeitos dessas novas partículas quando elas passam a interagir com o Homem e o ambiente. Estas propriedades diferenciadas podem ser problemáticas na perspectiva toxicológica, pois um composto inerte pode apresentar efeitos nocivos e tóxicos quando se apresenta em escala nanométrica (Paschoalino et al., 2010). As propriedades das NP

possibilitam sua entrada nas células, gerando efeitos negativos como danos ao DNA e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Azqueta e Dusinska, 2015; Marisa et al., 2015).

As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂-NP) se destacam pela sua alta produção industrial e aplicabilidade. Essa ampla utilização se deve à alta estabilidade das TiO₂-NP e às suas propriedades fotocatalítica e anticorrosiva (Hao et al., 2009). TiO₂ é um mineral que ocorre naturalmente no ambiente. No entanto, as propriedades diferenciadas quando está na forma nanoparticulado resultaram na produção em grande escala e ampla empregabilidade das nanopartículas de dióxido de titânio (Chen et al., 2014). TiO₂-NP são utilizadas na área cosmética, destacando seu uso na fabricação de protetores solares, nas indústrias alimentícia e farmacêutica, medicina, catálises, purificação de água e em materiais de construção civil (Hossain et al., 2014; Schaumann et al., 2015). Além disso, TiO₂-NP tem sido vastamente utilizadas em pigmentos, representando 70% da produção total de pigmentos no mundo todo (Chen et al., 2014).

As aplicações das TiO₂-NP têm aumentado o interesse e o avanço nas áreas envolvendo a fabricação, caracterização e compreensão mais profunda deste nanomaterial (Chen e Selloni, 2014). A sua vasta utilização acarreta um rápido crescimento na produção e, inevitavelmente, conduz a sua liberação para o ambiente aquático, podendo atingir efluentes e águas residuais. Um estudo recente analisou o destino e o transporte de TiO₂-NP e demonstrou que as mesmas têm capacidade de entrar nos lençóis freáticos e nos suprimentos de água potável (Schaumann et al., 2015).

A liberação das TiO₂-NP no ambiente aquático gera uma crescente preocupação com os efeitos nocivos que podem resultar dessa exposição aos animais

presentes neste meio. Além disso, a associação de NP com colóides que ocorrem naturalmente no ambiente aquático podem afetar a sua biodisponibilidade e absorção nas células e organismos (Moore, 2006).

1.2 Toxicidade e Biomonitoramento

Dióxido de titânio foi declarado biologicamente inerte para seres humanos e animais, mas sua forma nanoparticulada ($\text{TiO}_2\text{-NP}$) foi considerada como possivelmente carcinogênica para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2009). $\text{TiO}_2\text{-NP}$ levantam dúvidas sobre a sua toxicidade, uma vez que resultados controversos têm sido relatados sobre a genotoxicidade das $\text{TiO}_2\text{-NP}$ (Chen et al., 2014). Com a identificação de efeitos negativos da exposição às $\text{TiO}_2\text{-NP}$, aumenta a preocupação com a liberação destas partículas no ambiente. No compartimento aquático, as NP podem interagir com o meio, o qual apresenta condições químicas e físicas dinâmicas diferentes, e as características físico-químicas das NP irão afetar o seu comportamento e destino no ambiente aquático (Rocha et al., 2015) (Figura 2). Por fim, podem ocorrer desconhecidos e diferentes efeitos das NP quando comparados à sua forma original no estado antes de sua liberação, podendo ocorrer interações com biomoléculas dos meios biótico e abiótico que compõem os sistemas naturais (Vale et al., 2016). Além disso, liberadas no ambiente aquático, as NP podem interagir com os organismos aquáticos, podendo induzir efeitos tóxicos em diferentes níveis tróficos (Rocha et al., 2015). O modo de ação e os riscos biológicos desta interação das NP com os organismos aquáticos permanecem sem elucidação. A toxicidade química pela liberação de possíveis íons das NP e/ou a formação de ERO, e o estresse físico ou estímulo causado pelas

características das NP, como tamanho, forma e propriedades da superfície, são mecanismos difíceis de diferenciar, mas que devem ser considerados (Vale et al., 2016).

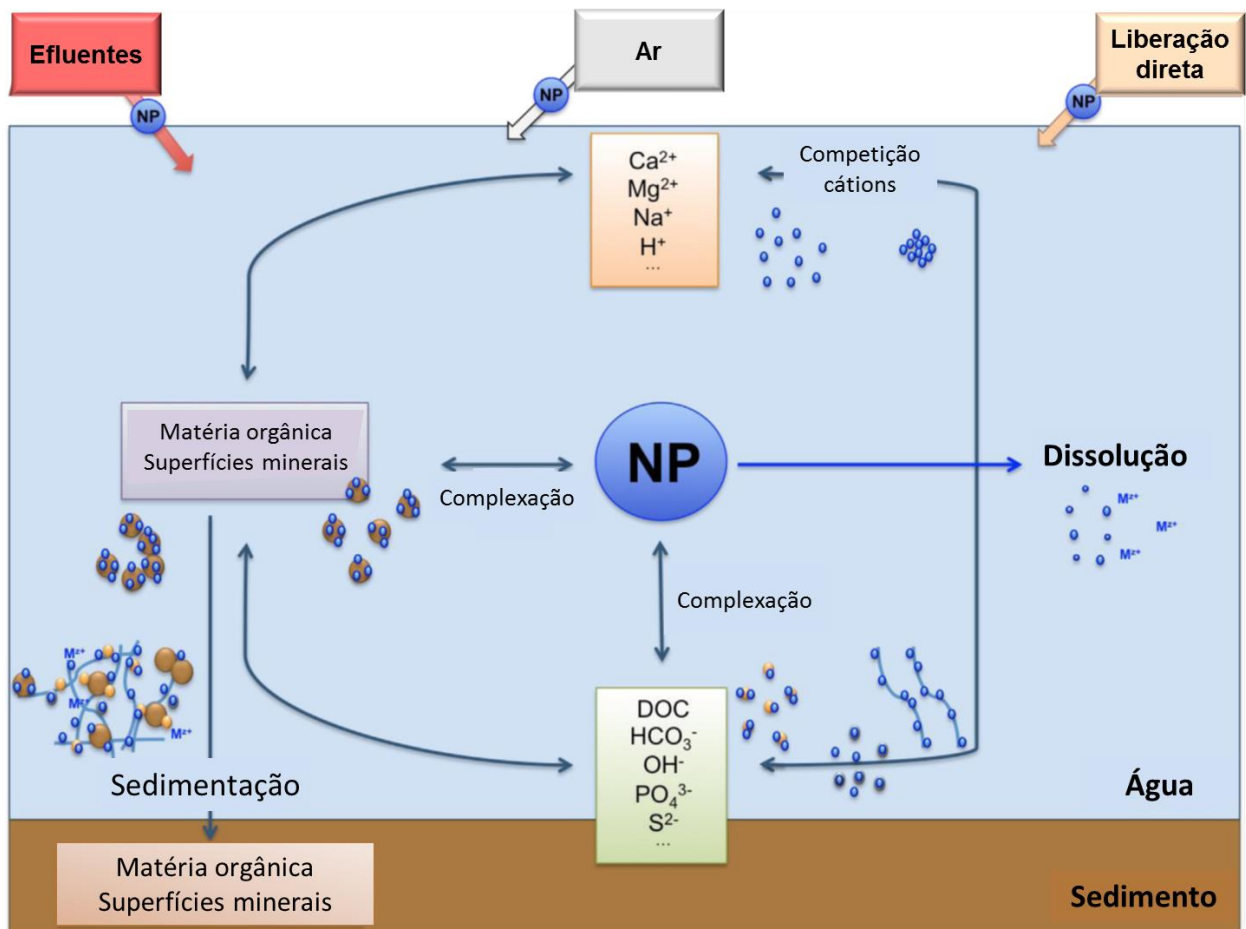


Figura 2. Representação das possíveis transformações físicas e químicas das NP presentes no ambiente aquático. As NP podem entrar através de efluentes, deposição pelo ar e liberação direta. No compartimento aquático podem ocorrer as seguintes transformações: dissolução, agregação e sedimentação. Essas transformações são dependentes das propriedades físico-químicas tanto das NP quanto do ambiente no qual foram liberadas. As NP podem interagir com cátions e ânions, matéria orgânica e superfícies minerais. Fonte: adaptado de Vale et al. (2016).

Como os organismos aquáticos estão no compartimento ambiental de grande recepção de efluentes, estudos na área da nanotoxicologia nos ecossistemas aquáticos têm se destacado pelo aumento de trabalhos publicados nos últimos anos. Um estudo realizado com zebrafish evidenciou que TiO_2 -NP causaram eclosão acelerada das suas larvas (Clemente et al., 2014), enquanto que outro trabalho verificou que TiO_2 -NP foram capazes de causar danos ao DNA deste organismo (Rocco et al., 2015). Li et al. (2015) realizaram uma pesquisa utilizando duas espécies de algas e evidenciaram que TiO_2 -NP foram capazes de inibir o seu crescimento, o que pode ser atribuído ao estresse oxidativo causado pela produção de ERO nas células das algas (Li et al., 2015). O estudo desenvolvido com a espécie de mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis* demonstrou que a exposição dos organismos às TiO_2 -NP, em combinação com 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, causou aumento nos danos ao DNA das células desses mexilhões (Canesi et al., 2014).

Com o aparecimento das nanoestruturas, surge também a necessidade de um controle ambiental e toxicológico dessas NP, que traga segurança para a saúde humana e ambiental, sujeitas a essa exposição. Ainda é pouco o que se conhece sobre os verdadeiros efeitos toxicológicos das NP em geral, considerando que na literatura muitos trabalhos são desenvolvidos, mas com resultados controversos e sem uma padronização dos testes e técnicas realizados. Para um controle efetivo da toxicidade das NP, torna-se necessária a padronização de métodos de avaliação toxicológica com uma abordagem criteriosa quanto à exposição às NP, possibilitando a obtenção de resultados e parâmetros mais fidedignos.

A liberação de NP no ambiente aquático ocorre, em grande parte, de uma forma descontrolada, sem o conhecimento da quantidade de material liberado, das vias

de liberação e das possíveis interações com o meio. Uma vez presentes neste compartimento, as consequências dessas interações podem ocorrer em níveis mais elevados, com danos à saúde animal, riscos ecológicos e, possivelmente, riscos para os humanos. Sendo assim, é reconhecida a importância e a necessidade do biomonitoramento de NP no principal ambiente receptor através da realização de ensaios de ecotoxicidade em organismos aquáticos (Moore, 2006).

Um estudo recente de Rocha et al. (2015) apontou o ambiente aquático como potencial destino final dos nanomateriais e confirmou que moluscos bivalves são espécies modelo chave para o monitoramento da poluição aquática por nanomateriais (Figura 3). Esses animais destacam-se, entre a gama de organismos aquáticos existentes, por apresentarem ampla distribuição geográfica e ciclo de vida predominantemente sésil. Como organismos populares desta classe encontram-se os mexilhões, com representantes nos ambientes aquáticos marinho e de água doce. Estes organismos filtradores ativos podem capturar partículas em suspensão e acumular os compostos em seus tecidos, motivo este que torna os mexilhões bons biomonitores. Muito conhecidos na área de toxicologia, os mexilhões representam um modelo de organismo apropriado para caracterizar o impacto potencial das nanopartículas, justamente por ser um grupo alvo para as mesmas no ambiente aquático. Como se alimentam através do processo de filtração, esses animais podem remover os nanomateriais da coluna de água independentemente da forma em que se encontram (individuais, agregadas, complexadas com outros compostos) e acumular nos seus tecidos (Canesi et al., 2012; Montes et al., 2012; Rocha et al., 2015; Villela et al., 2006).

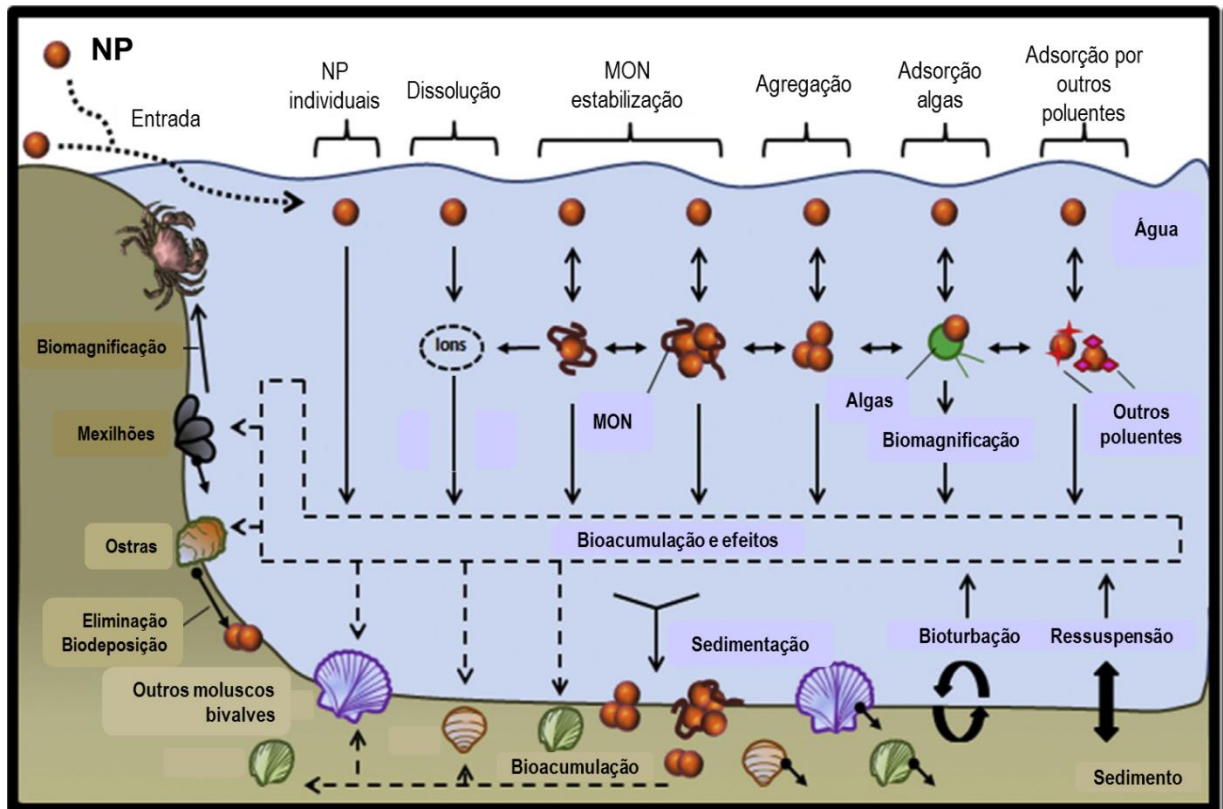


Figura 3. Esquema ilustrativo das possíveis interações e destino das NP no ambiente aquático e os processos biológicos associados com moluscos bivalves. No meio aquático, os animais podem interagir com as NP nas suas formas: individual, com os seus íons liberados, agregadas, estabilizadas por matéria orgânica natural (MON), adsorvidas por algas e/ou outros poluentes. Podem ocorrer a bioacumulação e a sedimentação das NP, podendo ser ressuspensas na água. A biomagnificação pode ocorrer atingindo os demais níveis tróficos. Fonte: adaptado de Rocha et al. (2015).

1.3 Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*)

Os moluscos bivalves representam alvos sensíveis à toxicidade de NP (Barmo et al., 2013; Canesi et al., 2012; Canesi et al., 2014; Rocha et al., 2015) com

processos altamente avançados de internalização de NP por endocitose (Canesi et al., 2012). Mexilhões são amplamente utilizados como biomonitores de perturbações ambientais (Villela et al., 2007; Villela et al., 2013), desde os ecossistemas marinhos aos de água doce. Além disso, a capacidade dos bivalves de acumular compostos tóxicos determina sua participação na transferência de poluentes ambientais aos mais altos níveis tróficos (Bolognesi e Fenech, 2012; Hunt et al., 2003).

A família *Mytilidae* abriga espécies de mexilhões como, por exemplo, a espécie *Mytilus sp.*, a qual é muito utilizada na avaliação do biomonitoramento marinho (Bolognesi e Fenech, 2012; Canesi et al., 2014). Outro representante desta família é a espécie *Limnoperna fortunei*, popularmente conhecida como mexilhão dourado (Figura 4). O mexilhão dourado é um bivalve exótico de água doce que foi introduzido na América do Sul através da água de lastro de navios provenientes do sudeste da Ásia (Darrigran e Pastorino, 1995). Sua primeira ocorrência no estado de Rio Grande do Sul foi registrada na bacia do Guaíba em 1998 (Mansur et al., 1999) e, posteriormente, atingindo o porto da cidade de Porto Alegre, com ótima adaptação na Região Hidrográfica do Lago do Guaíba, em Itapuã, no município de Viamão (Figura 5), se estendendo pela Lagoa dos Patos (Mansur et al., 2003).



Figura 4. Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). Fonte: Francine Girardello.

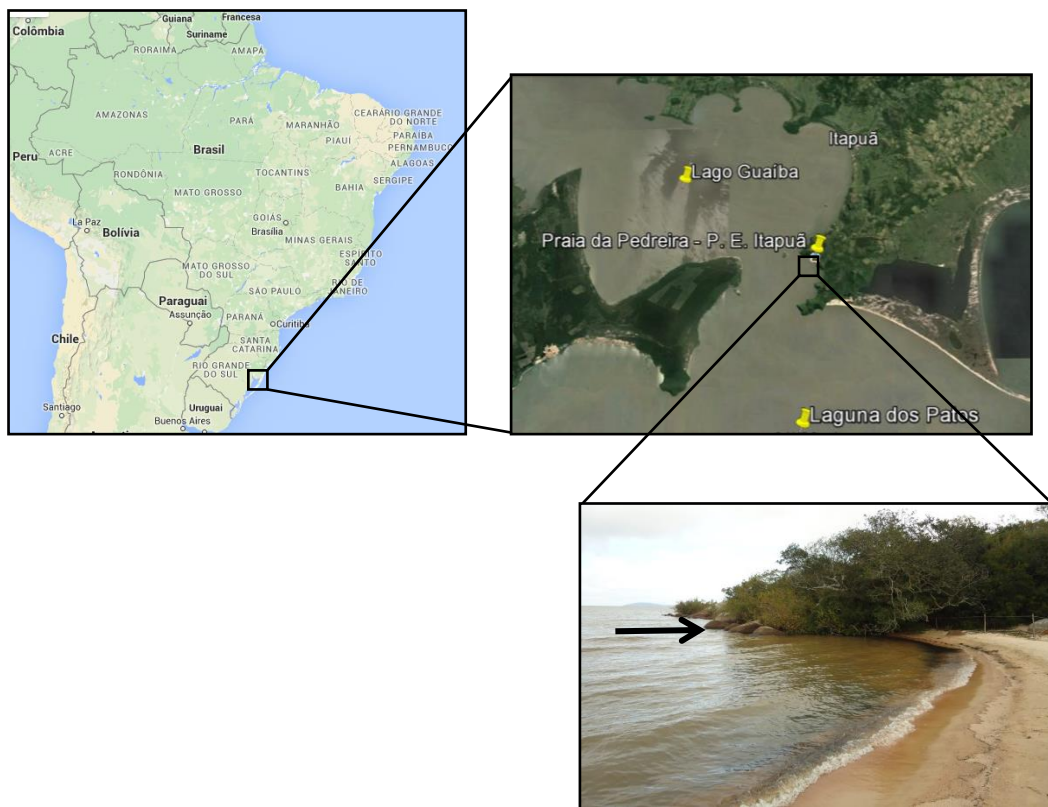


Figura 5. Local de coleta do mexilhão dourado, na Região Hidrográfica do Lago do Guaíba, em Itapua, no município de Viamão, no Rio Grande do Sul.

O *L. fortunei* possui ampla distribuição no sul do Brasil devido ao seu alto poder reprodutivo e a falta de predadores naturais, o que favorece a formação de grandes aglomerados. O mexilhão dourado se reproduz com frequência e as estações reprodutivas duram por um longo período, com o pico desse período estendendo-se de março a novembro (Xu et al., 2015). Essas características possibilitam a disponibilidade de encontrar este organismo em praticamente todas as épocas do ano, tornando-o um bom candidato a organismo sentinela (Mansur et al., 2003). Além disso, a utilização do mexilhão dourado como organismo sentinela permite facilidade tanto na coleta como na manipulação destes animais. *L. fortunei* tem sido utilizado com o propósito de biomonitoramento das condições ambientais em diversos trabalhos (Iummato et al., 2013; Mariano et al., 2006; Villela et al., 2013). O estudo realizado por Villela et al. (2006) sugere o *L. fortunei* como um potencial organismo biomonitor, mostrando que o uso do mexilhão dourado é apropriado para detectar contaminantes ambientais genotóxicos e mutagênicos. Além disso, esse trabalho padronizou e validou os métodos utilizados para os testes cometa e micronúcleos utilizando as células da hemolinfa deste organismo (Villela et al., 2006). Em outros estudos realizados por Villela et al. (2007; 2013), o mexilhão dourado também mostrou-se um bom organismo bioindicador para a avaliação da contaminação urbana, apresentando resposta mutagênica e genotóxica.

As características de distribuição no Rio Grande do Sul, períodos do ano, possibilidade de coleta e manipulação do organismo tornam o *L. fortunei* uma ferramenta atrativa para sua utilização no biomonitoramento de NP e um bom candidato a organismo sentinela na avaliação da toxicidade de TiO₂-NP no meio aquático.

1.4 Genotoxicidade e Mutagenicidade

A avaliação do potencial genotóxico e mutagênico é um aspecto importante na identificação de risco toxicológico das substâncias e vem sendo muito empregada na área da nanotoxicologia (Carmona et al., 2015; Donner et al., 2016; Girardello et al., 2016a; Pfuhler et al., 2013; Reis et al., 2015). A caracterização e o entendimento da relação existente entre a toxicidade e a estrutura das NP são necessários para o desenvolvimento de produtos que ofereçam tamanhos, formas, área de superfície e revestimentos apropriados, apresentando menor risco toxicológico humano e ambiental, sem perder, no entanto, as propriedades físico-químicas desejáveis (Jones e Grainger, 2009; Sycheva et al., 2011).

Genotoxicidade é o potencial de determinadas substâncias de causar danos diretos ou indiretos na molécula de DNA, podendo a célula, como resposta a estas lesões, corrigir ou não estes danos. Esta possível correção se dá por meio da atividade de enzimas dos sistemas de reparo de DNA. Se estes danos não forem corretamente reparados podem levar a mutações gênicas ou cromossômicas, as quais, por sua vez, podem participar da indução ou promoção de carcinogênese (Doak et al., 2012). Estudos mostram a ação direta de NP na molécula de DNA causando danos oxidativos ou, indiretamente, causando danos por interação com biomoléculas intermediárias ou proteínas envolvidas na maquinaria de divisão celular (Sycheva et al., 2011).

Para a detecção do potencial genotóxico de substâncias, o ensaio cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) permite a avaliação e determinação de danos no DNA de células eucarióticas, independente de estarem ou não em divisão. Este ensaio utiliza um número reduzido de células, bastando ter uma boa suspensão celular, em cultura (*in vitro*) ou extraídas de organismos expostos (*in vivo*) (Azqueta e Dusinska, 2015). Com

sensibilidade para detectar baixos níveis de dano ao DNA, o ensaio cometa é capaz de detectar quebras de cadeia simples e/ou dupla no DNA, reparo por excisão, sítios alcalilábeis e pontes intercadeia de DNA (*crosslinks*). Além disso, este ensaio caracteriza-se por se apresentar como uma técnica flexível, de baixo custo e fácil aplicação (Azqueta e Dusinska, 2015). Na técnica do ensaio cometa, as células embebidas em gel de agarose são lisadas e submetidas a uma corrente elétrica a qual permite a migração dos fragmentos de DNA danificado para fora do núcleo celular. As células normais são identificadas por apresentar núcleo redondo, sem dano perceptível ao DNA. As células que apresentam qualquer lesão ao material genético são identificadas, através de análise visual, por apresentar uma espécie de cauda, formada pelos fragmentos de DNA que migraram, no formato de um cometa (Figura 6). A identificação do dano ao DNA pode ser realizada pela mensuração dos fragmentos de DNA presentes na cauda, em que seu tamanho, forma e intensidade são considerados na realização da mensuração dos danos.

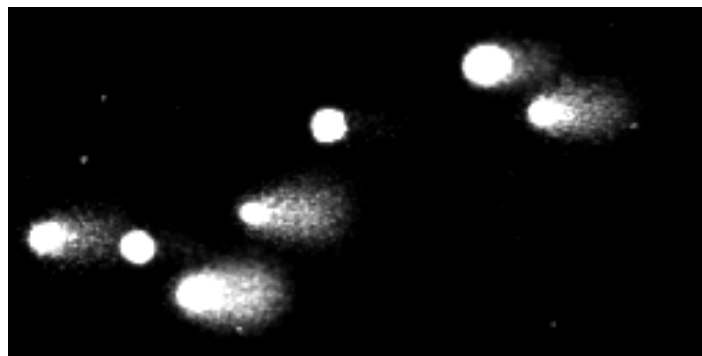


Figura 6. Fragmentos do DNA danificado migram para fora do núcleo formando uma cauda que lembra a forma de um cometa. O tamanho, formato e intensidade da cauda estão relacionados com o nível de dano no DNA da célula. A imagem apresenta os fragmentos de DNA dos hemócitos do *Limnoperna fortunei*, utilizados no presente trabalho. Fonte: Francine Girardello.

O ensaio cometa vem sendo muito aplicado na área da nanotoxicologia com destaque na avaliação da genotoxicidade de NP e determinação dos possíveis danos causados no DNA das células (Carmona et al., 2015; Karlsson, 2010). A genotoxicidade de TiO₂-NP nos sistemas aquáticos têm sido avaliada por este ensaio, possibilitando a detecção dos danos primários ao DNA das células dos organismos após sua exposição às TiO₂-NP (Nigro et al., 2015). O trabalho desenvolvido com zebrafish mostra a ação genotóxica de TiO₂-NP, as quais causaram danos significativos ao DNA das células deste organismo (Rocco et al., 2015). Além disso, outro estudo utilizando o ensaio cometa, revelou que TiO₂-NP, em combinação com 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxina, causaram aumento nos danos ao DNA das células do mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al., 2014).

Enquanto o ensaio cometa detecta lesões recentes no DNA passíveis de reparo, a nível molecular, o teste de micronúcleos (MN) detecta os danos irreparáveis (Frenzilli et al., 2009) (Figura 7), determinando de forma indireta os danos a nível cromossômico.

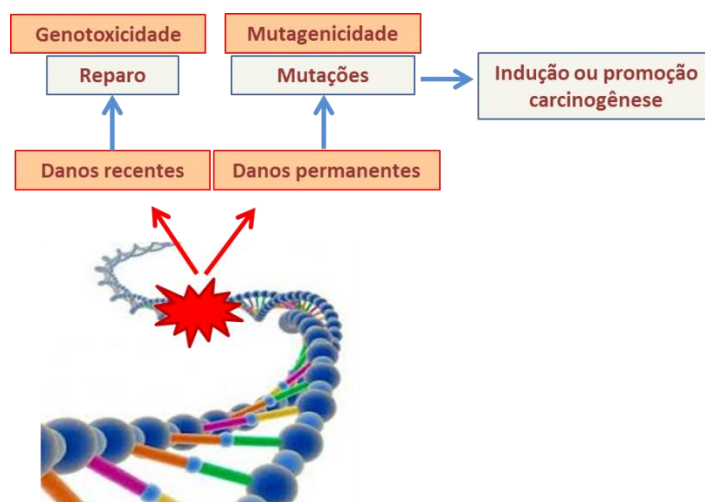


Figura 7. Danos no DNA. Danos recentes são passíveis de reparo e se referem à genotoxicidade avaliada, enquanto que os danos irreparáveis permanecem no material genético e podem levar a mutações, acarretando mutagenicidade, podendo induzir ou promover a carcinogênese celular.

O teste de MN é uma ferramenta citogenética padrão para análise indireta das anomalias cromossômicas estruturais ou numéricas induzidas em eucariotos (Reis et al., 2015), capaz de analisar tanto a presença de quebras cromossômicas do tipo clastogênese (perda de fragmentos cromossômicos) e/ou aneugênese (perda de cromossomos inteiros) como danos no fuso mitótico (Benassi-Evans e Fenech, 2011; Thomas et al., 2009; Umegaki e Fenech, 2000). A importância da detecção de mutações consiste na sua relação direta com a carcinogênese (Bonassi et al., 2011). Na avaliação da mutagenicidade o teste de MN permite visualizar a formação de MN no citoplasma da célula, os quais consistem de pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico originados de um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico que não se integrou ao novo núcleo, após a etapa de anáfase do processo mitótico, constituindo um pequeno núcleo individual (Fenech, 2007) (Figura 8).

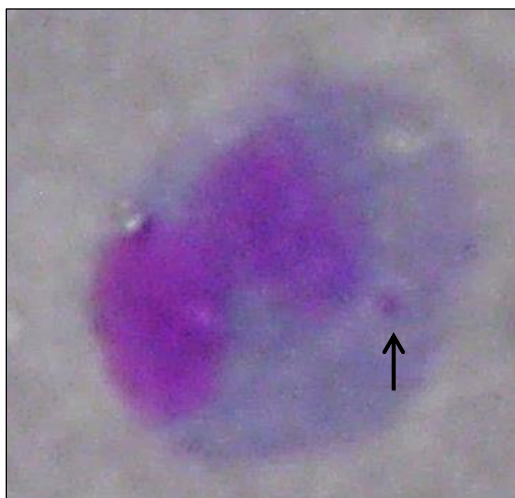


Figura 8. Formação do micronúcleo na célula.

O teste de MN é um ensaio citogenético bem estabelecido e reconhecido mundialmente, podendo ser realizado *in vitro* ou *in vivo*, utilizando células em cultura, vegetais ou animais, expostas diretamente aos agentes avaliados. Utilizado como um marcador do dano genético acumulado durante a vida celular, o teste de MN é um dos biomarcadores genotóxicos mais comumente aplicados em animais aquáticos (Bolognesi e Fenech, 2012). Além disso, esse teste é também muito utilizado em mexilhões de diferentes espécies para biomonitoramento em ambientes aquáticos (Bolognesi e Fenech, 2012; Klobučar et al., 2003; Parolini et al., 2010; Villela et al., 2006). As vantagens desta técnica consistem na simplicidade, facilidade e rapidez da análise, permitindo que um grande número de células possa ser analisado em um curto período de tempo, utilizando apenas um microscópio óptico e um contador de células (Fenech, 2000).

O dano cromossômico induzido pela exposição às NP tem sido avaliado pelo teste de MN, amplamente aceito para rastreamento da genotoxicidade destes materiais (Donner et al., 2016; Pfuhler et al., 2013). A avaliação do potencial genotóxico de NP de óxido de zinco foi realizada através da utilização do teste de MN, o qual teve como resultado o aumento na frequência de MN nas células (Reis et al., 2015). Além disso, Donner e colaboradores (2016) avaliaram a indução de MN nas células de ratos expostos a diferentes tipos de TiO₂-NP, no entanto seus resultados não mostraram atividade genotóxica nas amostras testadas. Estes trabalhos recentes citam o teste de MN como uma ferramenta citogenética de grande importância na detecção de danos cromossomais, destacando o seu uso na área da nanotoxicologia.

1.5 Estresse Oxidativo e Defesas antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio incluem os radicais livres derivados do oxigênio, como ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (HO[•]), e as espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio singlete (¹O₂), e o ozônio (O₃) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Um radical livre é definido como um átomo, uma molécula ou um íon que apresenta pelo menos um elétron não emparelhado na camada de valência, sendo altamente instável com capacidade de reagir com outras moléculas, podendo receber ou doar elétrons (Ferrari et al., 2011).

A redução do O₂ é um dos principais mecanismos de formação de ERO, onde a simples adição de um elétron à molécula de O₂ resulta no produto inicial O₂^{•-}. O O₂^{•-} é capaz de reagir com outras moléculas e gerar espécies reativas secundárias como, por exemplo, na reação com o ácido nítrico, gerando principalmente o ânion

peroxinitrito que, apesar de sua meia-vida curta, pode atravessar membranas e reagir com biomoléculas, danificando-as (Denicola e Radi, 2005). O $O_2^{\cdot-}$ formado pode ser rapidamente dismutado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (Sod), gerando H_2O_2 e O_2 (Figura 9).

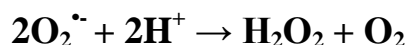


Figura 9. Ação da enzima superóxido dismutase na degradação de $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 .

O H_2O_2 pode ser decomposto pela enzima catalase (Cat) gerando H_2O e O_2 (Figura 10) ou pela glutathiona peroxidase (GPx). A Cat realiza a detoxificação de H_2O_2 quando sua concentração é elevada, enquanto a GPx atua em baixas concentrações de H_2O_2 . O H_2O_2 tem tempo de meia vida longo e é capaz de atravessar facilmente a membrana plasmática, podendo reagir com proteínas ligadas ao ferro (Fe^{+2}) e ser convertido no radical HO^{\cdot} . O HO^{\cdot} é muito reativo e, embora possua meia vida curta, é muito tóxico às proteínas, aos lipídios e ao DNA (Halliwell e Gutteridge, 2015).



Figura 10. Ação da enzima catalase na degradação de H_2O_2 , gerando H_2O e O_2 .

A Figura 11 ilustra a geração das ERO citadas e as defesas antioxidantes enzimáticas envolvidas.

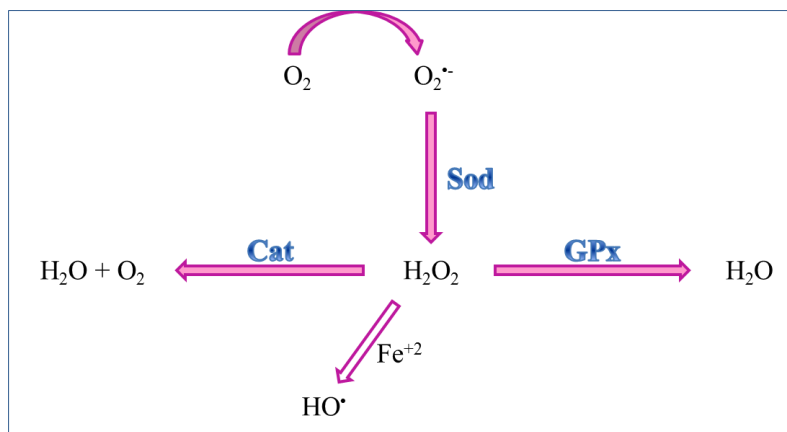


Figura 11. Geração de ERO e defesas antioxidantes enzimáticas. Elétrons podem reagir com o O_2 formando $O_2^{\bullet-}$. A enzima antioxidante Sod dismuta o $O_2^{\bullet-}$ gerando H_2O_2 o qual, por sua vez, pode ser decomposto pela enzima GPx ou pela enzima Cat a H_2O e O_2 . Alternativamente, o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com metais de transição como o Fe^{2+} formando HO^{\bullet} (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Superóxido dismutase é a principal enzima relacionada à dismutação do $O_2^{\bullet-}$ enquanto que a Cat é a enzima fundamental envolvida na detoxificação de H_2O_2 . Mudanças nos parâmetros de Sod e Cat podem estar ligadas ao destino populacional e também à mortalidade em invertebrados (Canesi et al., 2010). Além disso, Sod e Cat são considerados biomarcadores extremamente úteis em casos em que o componente tóxico é suspeito de estar causando estresse oxidativo (Canesi et al., 2010; Giarratano et al., 2014).

A atividade da enzima Sod pode ser determinada indiretamente através da medida da formação do adrenocromo, resultante da autooxidação da adrenalina. A atividade enzimática será inversamente proporcional à formação do adrenocromo (Bannister e Calabrese, 1987). A avaliação da atividade da enzima Cat consiste na medida da velocidade de consumo do H₂O₂ na amostra estudada. Essa determinação é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética que mede a velocidade de decomposição de H₂O₂ em diferentes intervalos de tempo (Aebi, 1984).

Além dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos, existem os sistemas não enzimáticos, também com o objetivo de se defender dos danos causados pelas espécies reativas, minimizando seus efeitos deletérios (Figura 12).



Figura 12. Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Adaptado de Carochó e Ferreira (2013).

O sistema de defesa não enzimático inclui vitaminas, carotenoides, compostos fenólicos, entre outros (Halliwell e Gutteridge, 2015), com capacidade de se combinar com outros radicais minimizando os danos oxidativos (Carocho e Ferreira, 2013).

Marcadores bioquímicos de danos oxidativos têm sido utilizados em mexilhões para detectar os níveis de modificações oxidativas nas moléculas, como em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Giarratano et al., 2014; Patetsini et al., 2013).

Os lipídios são alvos fáceis das espécies reativas e são oxidados em condições de estresse oxidativo. Esses danos ocorrem através de reações em cadeia após o ataque de espécies reativas, provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo, conseqüentemente, a entrada de substâncias que normalmente não atravessam a bicamada lipídica, levando a inúmeros eventos intracelulares. A peroxidação lipídica tem como produtos finais os compostos de baixo peso molecular, hidrocarbonetos e aldeídos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA). O conteúdo de MDA formado pode causar lesões às proteínas e/ou reagir com o DNA, causando danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2015). A determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método antigo e muito utilizado para medir a peroxidação de ácidos graxos e membranas celulares, sendo um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo lipídico. Esse método detecta não somente o MDA, mas também outros aldeídos produzidos na lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Os danos oxidativos às proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte. As interações de proteínas com ERO desempenham um papel de controle na sinalização celular que afeta a remodelação, crescimento e morte celular (Aksenov e Markesbery, 2001; Xie et al., 2014). A

carbonilação de proteínas pode ocorrer por oxidação direta dos aminoácidos das cadeias laterais, pela interação das proteínas com produtos finais da peroxidação lipídica, e também através de reações de glicação. A reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), formando 2,4-dinitrofenilidrazona, tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine et al., 1990).

Marcadores detectáveis de oxidação proteica incluem alterações no conteúdo de proteínas carboniladas, nitrotirosinas, produtos finais de glicação avançados, e mudanças no conteúdo tiol de proteínas. Cisteínas são alvos sensíveis para uma variedade de pró-oxidantes. As células possuem um sistema que regula o estado redox de tióis celular e protege as proteínas da excessiva oxidação. Ele inclui doadores de baixo peso molecular de grupos sulfidril (SH) e enzimas, os quais podem catalisar a redução de grupos SH em proteínas e desintoxicar prooxidantes por conjugação com glutatona (GSH). A diminuição de grupos SH livres nas proteínas está relacionada com o aumento do dano oxidativo nas proteínas (Aksenov e Markesbery, 2001; Xie et al., 2014). O conteúdo sulfidril de proteínas pode ser avaliado através do ensaio baseado na redução de 5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzoico) (DTNB) pelos tióis, gerando um derivado de cor amarela, 2-nitro-5- ácido tiobenzoico (TNB), detectado pela sua absorção espectrofotometricamente. O conteúdo sulfidril é inversamente correlacionado com danos oxidativos às proteínas (Aksenov e Markesbery, 2001; Xie et al., 2014).

A avaliação do estresse oxidativo é uma ferramenta muito utilizada e vem sendo bastante discutida da área de nanotoxicologia (Vale et al., 2016). A grande área superficial apresentada pelas NP possibilita propriedades físicas e químicas únicas, as quais permitem que as NP entrem nas células causando danos ao DNA e geração de

ERO (Azqueta e Dusinska, 2015). Além disso, já foi demonstrado que a exposição a diferentes tipos de suspensões de NP induzem mudanças nos biomarcadores enzimáticos em mexilhões (Canesi et al., 2010).

Após a indução de ERO, uma série de respostas biológicas complexas pode ser desencadeada pelo ataque ao DNA, às proteínas e lipídios das células (Al-Subiai et al., 2012; Carochó e Ferreira, 2013), incluindo a capacidade de depletar as defesas enzimáticas como a Sod e Cat e as não enzimáticas como grupos sulfidril ligados às proteínas (Katsumiti et al., 2014). A superprodução de ERO pode ocasionar o rompimento do equilíbrio entre a geração de ERO e as defesas antioxidantes podendo levar ao estresse oxidativo nos tecidos dos organismos e causar cito e genotoxicidade. Esse mecanismo é um dos mais estudados na área da nanotoxicologia (Figura 13) (Vale et al., 2016).

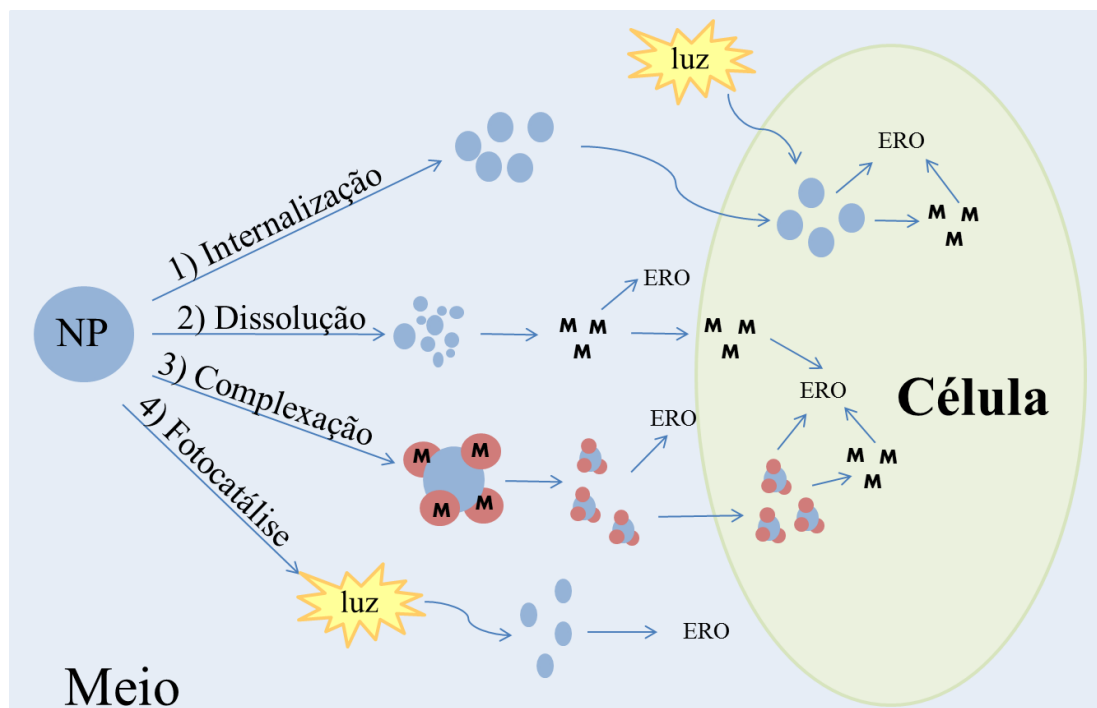


Figura 13. Representação das possíveis rotas para a geração de ERO na presença de NP. (1) Internalização poderia gerar ERO devido à dissolução das NP nas células e/ou à atividade fotocatalítica das NP. (2) Dissolução das NP levaria ao aumento na concentração de íons metálicos (M) no meio, podendo alguns desses metais serem capturados pelos organismos. (3) NP podem adsorver/complexar outros metais presentes no meio, podendo ser tomados pelas células. (4) Atividade fotocatalítica das NP na presença da radiação ultravioleta e/ou luz natural. Fonte: adaptado de Vale et al., (2016).

De uma perspectiva ecotoxicológica, tem sido demonstrado que TiO_2 -NP induzem mudanças no metabolismo redox, alterando os marcadores relacionados à oxidação de biomoléculas (Canesi et al., 2010; Iummato et al., 2013). Estudos encontraram mudanças nas defesas antioxidantes enzimáticas de diferentes organismos aquáticos expostos às TiO_2 -NP, como embriões de zebrafish (Faria et al., 2014), abalone marinho (Zhu et al., 2011), carpa jovem (Hao et al., 2009), mexilhão marinho *Mytilus*

galloprovincialis (Canesi et al., 2010) e mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Girardello et al., 2016a).

O sistema imune dos organismos aquáticos é considerado como alvo sensível para os efeitos da exposição às NP (Jovanović e Palić, 2012) e respondem a uma variedade de contaminantes, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* (Barmo et al., 2013). Os hemócitos são células do sangue dos mexilhões e seu papel mais importante é a defesa interna, uma vez que eles são as principais células efetoras do sistema imunológico. Além disso, os hemócitos estão envolvidos em muitas funções, incluindo digestão, transporte de metabólitos e reparo da concha e de feridas (Travers et al., 2008). Os bivalves apresentam dois tipos principais de hemócitos: os hialinócitos contêm poucos ou nenhum grânulo, e um núcleo circular e centrado; os granulócitos contêm grânulos e um núcleo acêntrico, circular a oval (Travers et al., 2008). Funcionalmente, ambos hemócitos podem formar pseudopodes, fagocitar partículas e produzir espécies reativas de oxigênio, com o objetivo de destruir as partículas (Cima et al., 2000). Em moluscos, o processo de fagocitose é um dos mais importantes mecanismos para eliminação de partículas (Marisa et al., 2015).

Diante dos aspectos mencionados, destaca-se a importância do conhecimento sobre os possíveis efeitos da exposição às TiO₂-NP como consequência de seu crescente uso e consequente liberação no ambiente. Estudos que possibilitem o conhecimento sobre o comportamento e as reações das TiO₂-NP tornam-se de necessidade imediata, utilizando diferentes e avançadas tecnologias para elucidar as inúmeras questões que abrangem a área da nanotoxicologia e que possam tornar mais claros os efeitos da exposição involuntária a estes nanomateriais.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genotóxico, mutagênico e de estresse oxidativo de TiO₂-NP *in vivo* utilizando o mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* como possível organismo biomonitor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as TiO₂-NP com relação a tamanho, dimensões e aspectos da superfície, utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raios X (DRX) e determinação da área superficial pelo método de Brunauer – Emmett – Teller (BET);
- Caracterizar e avaliar a dinâmica das TiO₂-NP nas soluções, em água coletada no Parque Estadual de Itapuã, utilizando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta;
- Avaliar a resposta genotóxica das células de hemolinfa do mexilhão dourado frente sua exposição às TiO₂-NP, utilizando o ensaio cometa;
- Avaliar a resposta mutagênica das células da hemolinfa do *L. fortunei* frente sua

exposição às TiO₂-NP, utilizando o teste de micronúcleos.

- Analisar o estresse oxidativo no mexilhão dourado frente sua exposição às TiO₂-NP pela avaliação dos danos oxidativos a lipídios e proteínas.
- Determinar a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase e catalase do *L. fortunei* após exposição às TiO₂-NP.
- Determinar a atividade antioxidante não enzimática através do conteúdo sulfidril de proteínas do mexilhão dourado após exposição às TiO₂-NP.
- Determinar a distribuição e a internalização celular das TiO₂-NP nos hemócitos do mexilhão dourado após exposição utilizando MET.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*

Artigo publicado na revista Aquatic Toxicology

Neste capítulo é apresentado o artigo intitulado “Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*”, publicado na revista *Aquatic Toxicology*. Este artigo avaliou o potencial genotóxico, mutagênico e de estresse oxidativo das TiO₂-NP no mexilhão dourado. O trabalho também abordou a utilização do *L. fortunei* como organismo biomonitor da exposição às TiO₂-NP. Neste trabalho a genotoxicidade foi evidenciada após exposição do mexilhão dourado às TiO₂-NP. No entanto, essa exposição não foi capaz de causar mutagenicidade nas células da hemolinfa dos animais. Foi evidenciado adicionalmente que TiO₂-NP foram capazes de aumentar os níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas das células do *L. fortunei*. Os resultados obtidos com esse trabalho possibilitaram a identificação dos marcadores de danos ao DNA (ensaio cometa) e de estresse oxidativo, juntamente com as técnicas de caracterização das TiO₂-NP, como ferramentas sensíveis para a avaliação dos efeitos das TiO₂-NP no mexilhão dourado. Além disso, os dados encontrados demonstraram que o *L. fortunei* representa um importante alvo para a toxicidade das TiO₂-NP, evidenciando o potencial do mexilhão dourado como organismo sentinela para exposição às TiO₂-NP.

SEGUE O ARTIGO



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*



Francine Girardello^{a,*}, Camila Custódio Leite^a, Izabel Vianna Villela^b,
Miriana da Silva Machado^{b,c}, André Luiz Mendes Juchem^c, Mariana Roesch-Ely^a,
Andreia Neves Fernandes^d, Mirian Salvador^a, João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,c}

^a Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^b InVivo Research and Development, Rua Mariante 180, Sala 902, 90430-180 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Biophysics/Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Campus do Vale Setor 4, P.O. Box 43422, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15003, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2015

Received in revised form

26 November 2015

Accepted 28 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

Titanium dioxide nanoparticles

Comet assay

Micronucleus

Oxidative stress

Limnoperna fortunei

ABSTRACT

The widespread use of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NP) in consumer products is the cause of its appearance in wastewater and effluents, reaching the aquatic environment. The evaluation of the biological impact of TiO₂-NP and the need to understand its ecotoxicological impact to the aquatic ecosystem are of major concern. Bivalve mollusks may represent a target group for nanoparticle toxicity. *Limnoperna fortunei* (golden mussel), a freshwater bivalve organism that has been employed in biomonitoring environmental conditions. Comet assay, micronucleus test and oxidative damage to lipids and proteins were performed after the golden mussel was exposed to TiO₂-NP (1, 5, 10 and 50 μg mL⁻¹). The results demonstrate that TiO₂-NP can damage the DNA of haemocytes after 2 h of exposure and the genotoxic activity significantly increased after 4 h exposure to TiO₂-NP, at all the TiO₂-NP concentrations. TiO₂-NP was ineffective in causing mutagenicity in the haemolymph cells of golden mussel. The increase in the lipid peroxidation levels and carbonyl proteins after the exposure to TiO₂-NP indicates the induction of oxidative stress at 2 h exposure with similar results to all TiO₂-NP concentrations, but these effects did not occur at 4 h exposure. These results demonstrated that, although TiO₂-NP is not mutagenic to golden mussel, it does induce DNA damage and oxidative stress in these organisms.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decades the use of nanotechnology has expanded, increasing the applications of nanoparticles (Gelover et al., 2004; Shi et al., 2013; Simonet and Valcárcel, 2009) and TiO₂ nanoparticles (TiO₂-NP, <100 nm). These are mostly used in cosmetics, food and pharmaceuticals industries, catalysis, water purification and numerous construction materials (Hossain et al., 2014; Schaumann et al., 2015). Nanoparticles are very small, but they possess a high surface to volume ratio, which renders them high reactivity potential and unique physical and chemical properties from their conventional forms (Oberdorster et al., 2005).

The TiO₂-NP various applications have increased the interest and advancement in the areas involving the manufacturing, characterization and deeper understanding of this material (Chen and

Selloni, 2014). TiO₂-NP is likely to appear in wastewater and effluents and end up in the aquatic environment in large amounts due to its extensive use. The TiO₂-NP fate and transport study showed that it has negative biological effects, it can be biologically and physically mobile and contaminate ground and drinking waters (Schaumann et al., 2015). The fine TiO₂ particles have been declared biologically inert to humans and animals, but the applications of the nanoparticle raise the question about their biological inertness, controversial results have been reported about TiO₂-NP genotoxicity (Chen et al., 2014) as well.

The nanotoxicology studies in aquatic ecosystems have increased recently. The TiO₂-NP accelerated the larvae of zebrafish hatching (Clemente et al., 2014) and inhibited the growth of algae, which were damaged by ROS accumulation (Li et al., 2015). TiO₂-NP genotoxic potential in aquatic systems has been assessed by techniques such as comet assay, which detect primary DNA damage (Nigro et al., 2015). TiO₂-NP genotoxic action caused significant DNA damage to zebrafish (Rocco et al., 2015). In addition, a slight increase in DNA damage was detected in marine mussels exposed

* Corresponding author.

E-mail address: fgirardello@yahoo.com.br (F. Girardello).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.030>

0166-445X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

to TiO₂-NP in combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxins (Canesi et al., 2014).

Bivalve mollusks have been considered as a unique target group for nanoparticle toxicity (Barmo et al., 2013; Canesi et al., 2012; Libralato et al., 2013; Wang et al., 2014) and are a key model species for monitoring aquatic pollution by these materials, hence the aquatic environment is the potential ultimate fate for nanoparticles (Rocha et al., 2015). Therefore, the evaluation of the biological impact of TiO₂-NP and the need to understand its ecotoxicological impact on aquatic ecosystem are of major concern.

Nanoparticle toxicity has been investigated in bivalve mollusks, with highly advanced processes for the internalization of nanoparticles by endocytosis (Canesi et al., 2012). Moreover, the capacity of bivalves to bioaccumulate toxic compounds determines their participation in the transfer of environmental pollutants to higher trophic levels (Canesi et al., 2014; Hunt et al., 2003; Villela et al., 2006).

Limnoperna fortunei (golden mussel), a freshwater bivalve organism, has been employed in biomonitoring environmental conditions in several works (Iummato et al., 2013; Mariano et al., 2006; Villela et al., 2013). The use of this mussel has expanded greatly since its introduction in South America in 1991 (Pastorino et al., 1993) and was introduced seven years later in Rio Grande do Sul, the Southeast State of Brazil (Mansur et al., 1999). Some of its known properties such as great phenotypic plasticity, excellent adaptation, high fecundity, and attachment to several substrates enabled this golden mussel to colonize new environments. *L. fortunei* has a quick metabolism which stimulates response to genotoxic damage for shorter periods of time (Villela et al., 2006). The wide availability of this organism makes it a good candidate sentinel (Mariano et al., 2006; Villela et al., 2006). Villela et al. (2006) used the *L. fortunei* to detect genotoxic environmental contaminants and established the methodologies of the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and micronucleus test (MN) for this organism. The detection of the genotoxic contamination of the Guaíba Lake Hydrographic Region by the golden mussels confirmed that it is an effective biomonitor organism with sensibility to organic contaminants of urban origin (Villela et al., 2007).

In these aspects, the present study aims to assess *in vivo* genotoxic and mutagenic potential and oxidative stress after TiO₂-NP exposition to *L. fortunei*, to evaluate the sensibility of the golden mussel as a biomonitor organism for the TiO₂-NP contamination and to evaluate TiO₂-NP ecotoxicological behavior.

2. Material and methods

2.1. Animals

L. fortunei mussels were manually collected in the Itapuã State Park preservation area (RS, Brazil) (S30°21'25.8", W051°02'58.5"), which is a conservation unity protected by the environmental state department (<http://www.sema.rs.gov.br>, 2015). The mussels and water samples were collected and immediately transported to the laboratory at ambient temperature, according to the protocol described by Villela et al. (2006). About 100 mussels were placed in each aquaria containing 2 L of Itapuã water and kept under constant aeration at 19 ± 2 °C. Every 2 days, the mussels were fed with herbivorous fish blended mixture with Itapuã water. The experiments were conducted 10 days following the acclimation period.

2.2. Preparation of TiO₂-NP

TiO₂-NP (purity > 99.5%, ~21 nm) were obtained from Sigma–Aldrich. Prior to exposure, a stock solution was prepared using 1000 µg mL⁻¹ TiO₂-NP in ultra-pure water (Milli-Q®)

and sonicated (Sonicator USC-1400A UNIQUE) for 30 min before different concentrations of TiO₂-NP solutions were prepared (1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹). The solutions of TiO₂-NP were prepared using the water from the collection site of Itapuã State Park (Viamão, RS, Brazil) to mimic the natural environment of the golden mussel. The Itapuã water was filtered through a non-specific filtering process to remove large undesirable materials, using four layers of cheesecloth. Dispersion of nanoparticles was performed before exposing to mussels through sonication of TiO₂-NP solutions for 30 min.

2.3. Characterization of TiO₂-NP

The average dimensions, shape and morphology of TiO₂-NP powder were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEM JEOL 1200 Ex II, operating at 80 kV, equipped with a CCD camera. The crystalline phase of TiO₂-NP was analyzed by X-ray diffraction (XRD) using the Siemens D500 X-ray Diffractometer and performed in the 2θ range from 20 to 80 with a step size of 0.05, using CuKα (λ = 1.5406) radiation. Surface area was obtained by the method of Brunauer–Emmett–Teller (BET) (Brunauer et al., 1938), by nitrogen adsorption at –196 °C on a Micrometrics Tristar® II 3020 instrument, after pretreatment the sample under high vacuum at 70 °C, for 12 h.

Dynamic light scattering (DLS) was performed with a Brookhaven Instruments EMI 9863 equipped with a 35 mW He-Ne laser, 632.8 nm laser diode. The Zeta potential (ZP) measurement was carried out on a Zeta Potential Analyzer Brookhaven Instruments (λ = 660 nm) 31,450. The 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP solutions were freshly prepared to evaluate the hydrodynamic size distribution by DLS, the electric charge and stability of dispersion by ZP analysis.

2.4. Exposure to TiO₂-NP

Adult bivalves (2.05 ± 0.17 cm long) were divided into groups of 4 and exposed to 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP for two time points, 2 and 4 h. The control groups (untreated) were maintained in Itapuã water for 2 and 4 h, with the exception of the micronucleus test where the exposure time was 24 h. The lower concentrations used in the exposure assays also fell within the range of those observed in ecotoxicity tests using the same types of nanoparticles (Canesi et al., 2010; Chen et al., 2011; Shukla et al., 2011). The mussels were not fed during the exposure periods.

2.5. Comet assay

The comet assay was performed according to protocols described by Villela et al. (2006, 2013). Briefly, 10 µL of haemolymph extracted from the posterior adductor muscle with a hypodermic needle using a 1 mL syringe from a pool of 4 animals were centrifuged at 106 × g for 10 min, and then were added to 90 µL of low melting point agarose 0.75% (w/v), mixed, and placed on a microscope slide pre-coated with normal melting point agarose 1.5% (w/v). A coverslip was added, and the slides were immediately placed at 4 °C for 10 min. After agarose solidification the coverslips were removed and the slides were immersed in a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0–10.5) containing 1% Triton X-100 and 10% DMSO. The slides were kept in lysis solution at 4 °C, and protected from the light for 1.5 h. They were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.1) for 20 min for DNA unwinding. Electrophoresis was performed at 4 °C, using the same buffer at 0.8 V cm⁻¹ for 15 min (32 V; 380 mA). Every step was carried out under indirect red light. Following electrophoresis, the slides were neutralized in 400 mM Tris (pH 7.5), rinsed in distilled

water and left to dry overnight at room temperature. The slides were fixed for 10 min in ethanol at 4 °C, dried at room temperature, and kept in a refrigerator until analysis. The slides were rinsed and stained with SYBR Gold fluorescent stain. Later, the analyses of the slides were performed by means of an automated scoring PathFinder™ Screen Tox system (Imstar, France) (Sharma et al., 2012).

For each sample, cells were evaluated for genotoxicity by the analyzing the percentage of Tail DNA (the proportion of DNA in the comet tail) and Olive Tail Moment (derived information from both tail length and % tail DNA) parameters (Duez et al., 2003). Three biological and experimental replicates were prepared per time and concentration used, and each replicate consisted of a pool of haemolymph of four individuals each.

2.6. The micronucleus test

The micronucleus (MN) test was also performed according to the protocol adapted by Villela et al. (2006, 2013). Haemolymph was collected from the posterior adductor muscle in a 1 mL syringe previously washed with EDTA (10 mM), and fixed with an equal volume of sodium citrate (1%) for 5 min, and with 40% of formalin (4%) for 10 min. After fixation, haemolymph was centrifuged for 8 min at $106 \times g$ and the supernatant was removed, leaving enough amount to resuspend the cells. These were gently placed on the slide to prevent membrane damage. After overnight drying at room temperature, the slides were stained for 7 min in a solution of Giemsa at 3%. The cells with complete cytoplasm were analyzed and the presence or absence of MN was recorded. Two slides were produced from a pool of haemolymph (from four individuals each), per time and concentration used.

MN was identified in all the isolated cells with intact membranes according to the following criteria: spherical cytoplasmic inclusions with a defined contour, diameter smaller than approximately 1/3 of the main nucleus, color and texture similar to the nucleus, and absence of contact with the nucleus.

2.7. Oxidative damage to lipids and proteins

Oxidative damage to lipids and proteins were assessed in *L. fortunei* after 2 and 4 h exposure in different TiO₂-NP concentrations. The sample preparation was adapted following protocols taken from studies of Iummato et al. (2013). The soft bodies (~1 g) were homogenized in 0.154 M KCl (1:5 w/v) and centrifuged at $7200 \times g$ for 30 min and the supernatant was used for lipid and protein oxidative damage determination. The procedures were done at 4 °C.

Lipid peroxidation was monitored by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction, according to Wills (1966) with modifications. Specifically, 400 µL of supernatant from each sample was combined with 600 µL of 15% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated at 100 °C for 15 min. After cooling to room temperature, the samples were centrifuged at $5200 \times g$ for 30 min. The supernatants were isolated, and their absorbance was measured at 530 nm. Hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) was used as standard, and the results were expressed as nmol TMP/mg of protein.

Oxidative damage to proteins were measured based on the reaction of protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine et al., 1990). For the assay, 200 µL of DNPH (10 mM) or 200 µL of HCl (2 M) were added to 50 µL of supernatants. The reaction mixture was incubated in the dark for 30 min, and vortexed every 10 min. 250 µL of 20% trichloroacetic acid was added to each reaction mixture and centrifuged at $3300 \times g$ for 15 min. The supernatants from each sample were discarded and the pellets were washed 3 times with ethanol–ethyl acetate (1:1) to remove

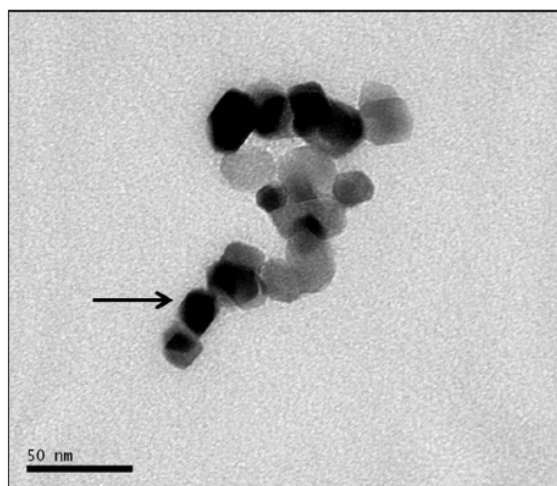


Fig. 1. Transmission electron microscopic (TEM) of TiO₂-NP powder. Media dimension of nanoparticles are of about 20 nm. Arrow points to a TiO₂-NP.

free reagent. The samples were centrifuged and the pellets were resuspended in 1000 µL of urea solution (8 M) at 37 °C, for 15 min. Absorbance was read at 365 nm, and the results were expressed as nmol DNPH/mg protein. Total protein content was determined according to Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.8. Statistics

Genotoxic and mutagenic results were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparisons test for each exposed group in relation to the control, and Student *t*-test for comparison between each exposure time to each TiO₂-NP concentration (Hothorn, 2014). Results for both oxidative damage to lipids and proteins assays were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test and Student *t*-test.

3. Results

3.1. Characterization of TiO₂-NP

Average size about 20 nm of nanoparticles was determined through TEM image of TiO₂-NP (Fig. 1), which is in accordance to declared size by the manufacturer. In Fig. 2, the XRD patterns revealed the presence of both anatase and rutile phase, with predominance of anatase crystalline phase, with major intensity signal located at $2\theta = 25.28^\circ$. The surface area of TiO₂-NP was $46.26 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

The results of DLS, for all samples, demonstrated that the scattering reflected in particle sizes larger than 500 nm extrapolate the maximum detection limit of the technique (500 nm) (data not shown). These aspects occur due to the formation of aggregates with larger diameter than 500 nm, which were observed for all experiments using water collected in State Park of Itapuã.

The physicochemical parameters of Itapuã water is represented in Table 1, with large amounts of organic matter (colloidal particles). The transparency of the solution containing nanoparticles decreased substantially with increasing TiO₂-NP concentration. The solution presented a cloudy aspect at the highest concentration used in this study ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The parameter Zeta potential (ζ) was employed to evaluate the stability of nanoparticles in aqueous solution, estimating

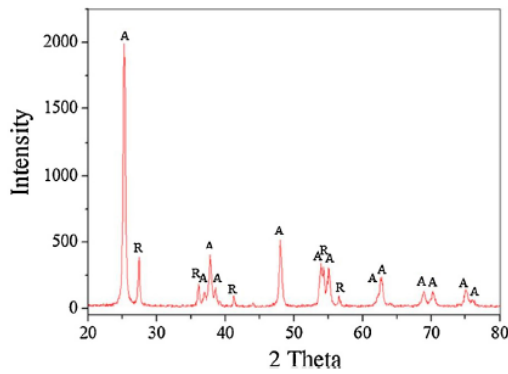


Fig. 2. X-ray diffraction (XDR) pattern of TiO₂-NP; the crystalline phases are anatase (A) and rutile (R).

Table 1
Physical-chemical parameters of Itapuã water.

Tests carried out	Results
Ammonia	<0.05 mg L ⁻¹
pH at 25 °C	7.46
Iron	0.140 mg L ⁻¹
Organic matter (oxygen consumed by reductive matter permanganate)	1.90 mg O ₂ L ⁻¹
Total dissolved solids	37 mg L ⁻¹
Sulfate	8.89 mg L ⁻¹
Chloride*	3.93 mg L ⁻¹
Total hardness*	30.00 mg CaCO ₃ L ⁻¹

Table 2
Physical-chemical characteristics of solutions in different TiO₂-NP concentrations.

TiO ₂ -NP concentration	Average zeta potential (mV) ^a
1 µg mL ⁻¹	17.90 ± 2.09
5 µg mL ⁻¹	18.21 ± 1.65
10 µg mL ⁻¹	18.29 ± 1.78
50 µg mL ⁻¹	15.65 ± 2.22
Itapuã water ^b	14.49 ± 0.89
1000 µg mL ⁻¹ in ultra-pure water ^c	31.67 ± 0.61

^a Data are presented as the mean ± standard deviation for 10 measurements.
^b Control.
^c Stock solution.

the particle surface potential that is related to the nanoparticles agglomerated rate. The average zeta potential was calculated and presented values from -15.65 ± 2.22 to -18.29 ± 1.78 mV for the TiO₂-NP solutions, -14.49 ± 0.89 mV for the control (Itapuã water) and -31.67 ± 0.61 for the 1000 µg mL⁻¹ in ultra-pure water (Table 2).

3.2. Comet assay

Alkaline comet assay (pH 12.1) was performed to investigate the potential of TiO₂-NP to induce DNA damage to haemolymph cells of golden mussel (*L. fortunei*) (Fig. 3). TiO₂-NP was able to increase DNA damage levels at 5 µg mL⁻¹ after 2 h exposure, with statistic significant difference in relation to the negative control for % Tail DNA. In the 4 h exposure assay, TiO₂-NP was also able to induce DNA breaks in all tested concentrations as showed by the % Tail DNA (Fig. 3A). The Olive Tail Moment increase to 1 and 10 µg mL⁻¹ concentrations after 4 h exposure (Fig. 3B). In this assay, significant difference was observed between different exposure times (2 and 4 h) in the same concentration of TiO₂-NP (1 and 10 µg mL⁻¹) for both % Tail DNA and Olive Tail Moment parameters (Fig. 3).

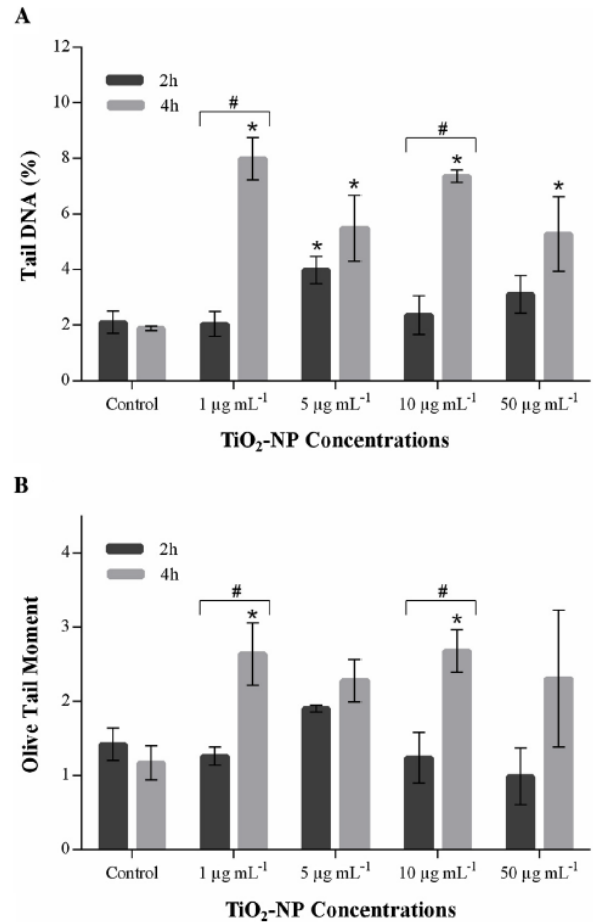


Fig. 3. Genotoxicity of TiO₂-NP in haemolymph cells (2 and 4 h exposition assays). Comet assay: Percentage of tail DNA (A) and Olive tail moment (B) statistical difference (**p* < 0.01). Comparing the two exposition times to each concentration was obtained statistical difference (#*p* < 0.01).

3.3. Micronucleus test

TiO₂-NP was not able to increase the MN frequency in golden mussel haemolymph in the concentrations and exposure times used in this experiment (Fig. 4). 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP concentrations increased mortality at the end of 24 h exposure period.

3.4. Oxidative damage to lipids and proteins

TiO₂-NP induced a dose-independent oxidative damage to lipids after 2 h, but not after 4 h of the treatments. Similar results were observed for oxidative protein damage with 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP. It is important to mention that the oxidative damage to proteins found after 4 h was lower than that observed after 2 h of treatments with 1, 5 and 10 µg mL⁻¹ TiO₂-NP (Table 3).

4. Discussion

The results of our study confirmed the genotoxicity of TiO₂-NP in haemocytes of golden mussel after 2 h exposure. Genotoxic activity increased after 4 h TiO₂-NP incubation, suggesting the activation of DNA repair mechanisms. Comet assay is so far the most used

Table 3
Evaluation of oxidative damage to lipids and proteins in golden mussel's soft body in different exposition times and TiO₂-NP concentrations.

TiO ₂ -NP concentrations	TBARS (nmol TMP/mg protein)		Carbonyl protein (nmol DNPH/mg protein)	
	(2 h)	(4 h)	(2 h)	(4 h)
Control	1.42 ± 0.01 ^b	1.44 ± 0.50 ^a	3.14 ± 0.01 ^c	3.03 ± 0.98 ^a
1 µg mL ⁻¹	2.62 ± 0.30 ^a	1.48 ± 0.39 ^a	3.66 ± 0.34 ^{bc}	2.32 ± 0.01 ^{a†}
5 µg mL ⁻¹	2.78 ± 0.11 ^a	2.22 ± 0.34 ^a	5.41 ± 0.01 ^a	2.45 ± 0.38 ^{a†}
10 µg mL ⁻¹	2.27 ± 0.13 ^a	2.12 ± 0.14 ^a	4.03 ± 0.01 ^b	2.91 ± 0.01 ^{a†}
50 µg mL ⁻¹	2.53 ± 0.01 ^a	2.06 ± 0.28 ^a	4.29 ± 0.28 ^b	3.76 ± 0.88 ^a

Data are presented as the mean ± standard deviation. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the same exposition time, one-way ANOVA and the Tukey's test, *p* < 0.05.

[†] Statistically significant difference between 2 and 4 h exposition assays, Student *t* test, *p* < 0.05.

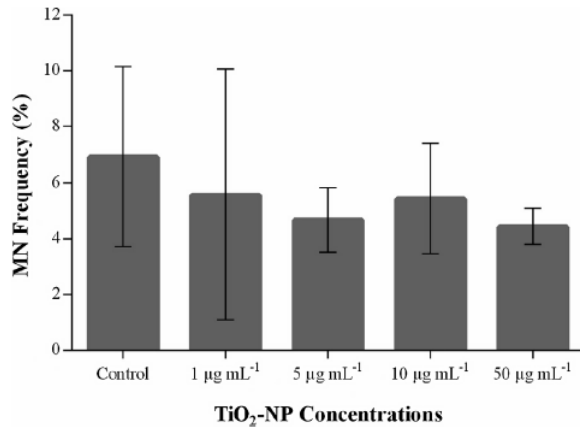


Fig. 4. Mutagenicity of TiO₂-NP in haemolymph cells (24 h exposition assays). The bars represent the micronucleus frequency on mononuclear cells. The controls refer to the same time exposition of the assays, 24 h.

method that evaluates nanogenotoxicology (Azqueta and Dusinska, 2015) and is a mature tool in the field of ecotoxicology, highlighting its application in mollusks bivalves, where haemocytes are the most common target for *in vivo* genotoxicity assessment (Lapuente et al., 2015; Villela et al., 2013). Primary DNA damage was demonstrated in different aquatic organisms exposed to TiO₂-NP in different systems such as in polychaete (Galloway et al., 2010), and in erythrocytes of the marine fish *Trachinotus carolinus* (Vignardi et al., 2015), as well as in human amnion epithelial cells (Saquib et al., 2012). Nanoparticles have the ability to diffuse into cells and they might interact with the biomolecules and DNA through TiO₂-NP binding direct to DNA or DNA repair enzymes, altering this system and leading to strain breaks, change of bases or chromosomal damage (Azqueta and Dusinska, 2015; Galloway et al., 2010). Furthermore, genotoxicity of nanomaterials can also result from its indirect interactions with DNA, such as the production of reactive oxygen and nitrogen species that induce DNA oxidation and the antioxidant defences depletion (Azqueta and Dusinska, 2015).

The types of lesions detected by the comet assay are generally recent and subjected to DNA repair, not developing into permanent lesions or clastogenic damage (Villela et al., 2006), which could be verified by the MN test (Azqueta and Dusinska, 2015). Moreover, it has been reported that, differently from what happens in the comet assay, the induction of MN by TiO₂-NP is affected by the characteristics of the medium of nanoparticles, obtaining negative results with medium that facilitates agglomeration processes (Demir et al., 2015). The medium used to mimic the natural environment of the golden mussel in this study (Itapuã water) presented a similar disadvantage, possibly inducing TiO₂-NP agglomeration. Particles may generate interactions with colloidal particles detected in the Itapuã water, making the solution unstable, leading to agglomeration

of the particles, corroborated by the zeta potential analysis. Zeta potential values between -30 mV and 30 mV mean that there are no forces to avoid aggregation and the system remains unstable (Duvarci and Çiftçioğlu, 2012). Besides the negative charge of TiO₂-NP in aqueous solution, due to the pH used (7.46) above of the isoelectric point (~pH 6) (Oliveira and Silveira, 2011; Zhu et al., 2014), the TiO₂-NP acts mainly as Lewis acid attracting negative charges, which implies the aggregation. In addition, *in vitro* studies demonstrate that the aggregation degree of nanoparticles can affect toxicity (Ates et al., 2013). Larger surface area of nanoparticles are related to higher cytotoxic and phototoxic effects (Xiong et al., 2013). Furthermore, the higher dose of TiO₂-NP demonstrated a strong toxicity to animals exposed for 24 h, inducing death (data not showed). These toxic effects can also be related to the negative results in the MN assay in 24 h of exposure to TiO₂-NP. As in most non-mammalian system that use the MN test without cell division markers (such as cytochalasin B), the toxicity can cause variations in the system (Villela et al., 2006). Higher doses of TiO₂-NP were applied for comet assay due to the lower exposure time (2 and 4 h). Quick metabolism of aquatic organisms promotes response to genotoxic damage for shorter periods of time, probably due to recent damage. To assess the micronucleus, the cells must have undergone cell division and, therefore, this assay needs a longer exposure time (Villela et al., 2006).

The increased damage revealed DNA breaks, which can be related to the repair system activation, can explain the oxidative damage to lipids and proteins. The decreasing in oxidative damage to lipids and proteins is probably because these damages can be repaired (Azqueta and Dusinska, 2015). Peroxidative damage to unsaturated fatty acids is a common response of oxidative stress and thus the increase in the TBARS levels has been considered as a marker of oxidative damage in aquatic organisms after TiO₂-NP exposure (Federici et al., 2007; Hao et al., 2009; Zhu et al., 2011). Regarding the protein damage, TiO₂-NP was able to modify the protein redox status of the mussel cells. The possible ability of increased surface area TiO₂-NP to adsorb more proteins can be related to this effect (Gao et al., 2011; Xiong et al., 2013). The oxidative stress induced by TiO₂-NP can play an important role in toxicity of nanoparticles area.

TiO₂-NP toxicity mechanisms should be further investigated for its behavior in different organisms and media exposure conditions variances, in order to understand its mechanisms of action. In addition, for a better assessment of the environmental risks of these nanoparticles, it is necessary to know the concentrations of this material in the aquatic environment. And the conditions under which it is distributed in the environment, for example, as well as the dispersion and aggregate properties.

5. Conclusions

The DNA damage and oxidative stress markers together with TiO₂-NP characterization represented a sensitive tool for assessment the effects of TiO₂-NP on golden mussel. The findings in

this study have demonstrated that the golden mussel represents a major target for TiO₂-NP toxicity. TiO₂-NP induced DNA damage potentially in haemolymph cells of golden mussel, as revealed by comet assay. However, there was no mutagenic effect after TiO₂-NP exposition. The function of the oxidative stress biomarkers was confirmed by the increase of protein carbonyl and lipid peroxidation levels in mussel cells exposed to TiO₂-NP. These results demonstrate the potential of golden mussel as a sentinel organism to TiO₂-NP exposure.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Conservation Unit Division (Divisão de Unidades de Conservação) of the environmental department of the state government (SEMA-RS) for allowing us to collect samples in Itapuã State Park (RS, Brazil) and the funding agencies Fapergs, CAPES and CNPQ for supporting this study.

References

Ates, M., et al., 2013. Bioaccumulation, subacute toxicity, and tissue distribution of engineered titanium dioxide nanoparticles in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Nanomater.*, 9.

Azqueta, A., Dusinska, M., 2015. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Front. Genet.* 6 (239).

Barmo, C., et al., 2013. In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 9–18.

Brunauer, S., et al., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.

Canesi, L., et al., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21.

Canesi, L., et al., 2010. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus hemocytes*. *Aquat. Toxicol.* 96, 151–158.

Canesi, L., et al., 2014. Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 153, 53–65.

Chen, T., et al., 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *J. Food Drug Anal.* 22, 95–104.

Chen, T.H., et al., 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Pollut. Bull.* 63, 303–308.

Chen, X., Selloni, A., 2014. Introduction: titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. *Chem. Rev.* 114, 9281–9282.

Clemente, Z., et al., 2014. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. *Aquat. Toxicol.* 147, 129–139.

Demir, E., et al., 2015. Genotoxic and cell-transforming effects of titanium dioxide nanoparticles. *Environ. Res.* 136, 300–308.

Duez, P., et al., 2003. Statistics of the comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18, 159–166.

Duvarci, Ö.Ç., Çiftçioğlu, M., 2012. Preparation and characterization of nanocrystalline titania powders by sonochemical synthesis. *Powder Technol.* 228, 231–240.

Federici, G., et al., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415–430.

Galloway, T., et al., 2010. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environ. Pollut.* 158, 1748–1755.

Gao, Y., et al., 2011. Proteomic analysis of early response lymph node proteins in mice treated with titanium dioxide nanoparticles. *J. Proteomics* 74, 2745–2759.

Gelover, S., et al., 2004. Titanium dioxide sol-gel deposited over glass and its application as a photocatalyst for water decontamination. *J. Photochem. Photobiol. A* 165, 241–246.

Hao, L., et al., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci. (China)* 21, 1459–1466.

Hossain, F., et al., 2014. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: applications, limitations and future perspectives. *Sci. Total Environ.* 466–467, 1047–1059.

Hothorn, L.A., 2014. Statistical evaluation of toxicological bioassays—a review. *Toxicol. Res.* 3, 418–432.

Hunt, J., et al., 2003. Bivalve bioaccumulation monitoring results. In: Estuary, S.F. (Ed.), RMP Annual Results 2003. San Francisco Estuary Regional Monitoring Program, San Francisco Estuary, Richmond, CA, pp. 1–17.

Iummato, M.M., et al., 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 123–129.

Lapiente, J., et al., 2015. The comet assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Front. Genet.* 6 (180).

Levine, R.L., et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478.

Li, F., et al., 2015. Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.* 158, 1–13.

Libralato, G., et al., 2013. Embryotoxicity of TiO₂ nanoparticles to *Mytilus galloprovincialis* (Lmk). *Mar. Environ. Res.* 92, 71–78.

Lowry, O.H., et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Mansur, M.C.D., et al., 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 7, 3.

Mariano, B., et al., 2006. Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei*. *Environ. Pollut.* 144, 280–288.

Nigro, M., et al., 2015. n-TiO₂ and CdCl₂ co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium: genomic, DNA and chromosomal damage evaluation in the marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Toxicol.* 168, 72–77.

Oberdorster, G., et al., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.

da Silva de Oliveira, J.S., da Silveira, L.G., 2011. Utilização de dióxido de titânio em processos fotocatalíticos para degradação de halofenóis. *Vivências* 7, 14.

Pastorino, G., et al., 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del RÁ-o de la Plata. *Neotropica* 39, 2.

Rocco, L., et al., 2015. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 223–230.

Rocha, T.L., et al., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. *Mar. Environ. Res.* 111, 74–88.

Saqib, Q., et al., 2012. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 351–361.

Schaumann, G.E., et al., 2015. Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: the quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. *Sci. Total Environ.* 535, 3–19.

Sharma, A.K., et al., 2012. The influence of the number of cells scored on the sensitivity in the comet assay. *Mutat. Res.* 749, 70–75.

Shi, H., et al., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 10, 15.

Shukla, R.K., et al., 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. In Vitro* 25, 231–241.

Simonet, B.M., Valcárcel, M., 2009. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 17–21.

Vignardi, C.P., et al., 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat. Toxicol.* 158, 218–229.

Villela, I.V., et al., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 605, 78–86.

Villela, I.V., et al., 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat. Res.* 628, 76–86.

Villela, I.V., et al., 2013. The use of genetic bioassays to evaluate the environmental quality in a region under the influence of urban waste in guaíba lake basin (Brazil). *J. Environ. Sci. Water Resour.* 2, 12.

Wang, Y., et al., 2014. Immune toxicity of TiO₂ under hypoxia in the green-lipped mussel *Perna viridis* based on flow cytometric analysis of hemocyte parameters. *Sci. Total Environ.* 470–471, 791–799.

Wills, E.D., 1966. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 99, 667–676.

Xiong, S., et al., 2013. Specific surface area of titanium dioxide (TiO₂) particles influences cyto- and photo-toxicity. *Toxicology* 304, 132–140.

Zhu, M., et al., 2014. The effect of humic acid on the aggregation of titanium dioxide nanoparticles under different pH and ionic strengths. *Sci. Total Environ.* 487, 375–380.

Zhu, X., et al., 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Mar. Pollut. Bull.* 63, 334–338.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles

Artigo publicado na revista Aquatic Toxicology

Neste capítulo é apresentado o artigo publicado na revista *Aquatic Toxicology* e intitulado “Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles”. Este artigo avaliou a capacidade de internalização das TiO₂-NP nas células do mexilhão dourado e sua interação com os hemócitos desse organismo. Além disso, as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas do *L. fortunei* foram avaliadas a partir da atividade das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat) e do conteúdo sulfidril de proteínas, após a exposição dos animais às TiO₂-NP. Este trabalho também abordou a utilização do *L. fortunei* como organismo biomonitor da exposição às TiO₂-NP.

A internalização das TiO₂-NP foi evidenciada nos hemócitos do mexilhão dourado, causando alterações na membrana das células. A atividade antioxidante enzimática do *L. fortunei* foi diminuída após a exposição às TiO₂-NP. No entanto, essa atividade foi restabelecida após um período maior de tempo. Esse comportamento também foi evidenciado para o conteúdo sulfidril de proteínas, relacionado com as defesas antioxidantes não enzimáticas do mexilhão dourado.

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram a identificação das TiO₂-NP nos hemócitos do mexilhão dourado, demonstrando a sua internalização nas células. A utilização de biomarcadores das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas comprovou sua aplicação como ferramentas adequadas na avaliação das TiO₂-NP no *L. fortunei* e dos seus efeitos no metabolismo redox do mexilhão dourado. Além disso, o conjunto de resultados encontrados aponta o *L. fortunei* como alvo importante para a toxicidade das TiO₂-NP, destacando seu potencial como organismo sentinela para exposição às NP.



Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles



Francine Girardello^{a,*}, Camila Custódio Leite^a, Catia Santos Branco^a, Mariana Roesch-Ely^a,
Andreia Neves Fernandes^b, Mirian Salvador^a, João Antonio Pêgas Henriques^{a,c,d}

^a Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^b Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15003, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Biophysics/Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Campus do Vale Setor 4, Box 43422, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^d InVitro Research and Development, Rua Mariante 180, Sala 902, 90430-180 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2016

Received in revised form 20 April 2016

Accepted 25 April 2016

Available online 27 April 2016

Keywords:

Titanium dioxide nanoparticles

Limnoperna fortunei

Transmission electron microscopy

Superoxide dismutase

Catalase

Protein sulfhydryl

ABSTRACT

TiO₂ nanoparticles (TiO₂-NP) have been incorporated into a large range of materials for different applications in the last decades and are very likely to appear in wastewater and effluents, eventually reaching the aquatic environment. Therefore, the assessment of the biological impact of TiO₂-NP on aquatic ecosystem is of a major concern. The mussels represent a target group for TiO₂-NP toxicity, as they are filter feeders and are capable of bioaccumulating toxic compounds. Furthermore, the exotic organism *Limnoperna fortunei*, golden mussel, is a freshwater bivalve that has been used in biomonitoring environmental conditions. In this work, the TiO₂-NP's ability to interact with haemocytes of golden mussel was assessed by transmission electron microscopy. The enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses were evaluated by superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat) activities and protein sulfhydryl content, which were measured after the golden mussel was exposed to TiO₂-NP (1, 5, 10 and 50 μg mL⁻¹). Results demonstrate that TiO₂-NP was internalized by cells, causing alterations in haemocytes membrane. Antioxidant activity of Sod and Cat decreased after 2 h TiO₂-NP exposure. After 4 h exposure, the enzymatic antioxidant activity was restored. Notably, the protein sulfhydryl content decreased after 2 h to all the TiO₂-NP concentrations and no alterations were observed after 4 h of TiO₂-NP exposure. These results demonstrate the potential of golden mussel as sentinel organism to TiO₂-NP exposure.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology studies have increased in the last decades and the development of nanoparticle materials has been used in a large range of different applications (Shi et al., 2013; Simonet and Valcárcel, 2009). The nanoparticles show large surface area, which renders them a unique physical and chemical properties that differ from those of their respective bulk materials (Oberdorster et al., 2005). The toxicity of transition metal oxide nanoparticles has been showed by the potential application of electrospray to disinfect airborne pathogens and of antimicrobial agent for airborne disease control (Wang et al., 2010; Wu et al., 2010). Nanoparticle composition, solubility and interaction modes with biological systems can be considered as the three main factors for risk assessment of metal

oxide nanoparticles (Wang et al., 2010; Wu et al., 2010). Among nanoparticles, TiO₂-NP (TiO₂-NP, <100 nm) has increasingly been added to sunscreens and cosmetics (Newman et al., 2009; Popov et al., 2005), paints (Shi et al., 2013), and surface coatings (Kaida et al., 2004). TiO₂-NP causes ecotoxicological problems due to the increase of its production and anthropogenic input into the aquatic environment (Jovanović and Palić, 2012). The major concern is the harmful effects that may result from exposure of aquatic animals to nanoparticles and their aggregates. Besides, the association of nanoparticles with naturally occurring colloids could affect their bioavailability and uptake into cells and organisms (Moore, 2006).

Bivalve mollusks are sensitive targets for nanoparticles toxicity (Barmo et al., 2013; Canesi et al., 2012; Canesi et al., 2014) and internalize nanoparticles by endocytosis mechanisms (Canesi et al., 2012). Mussels are widely used as biomonitors of environmental perturbations (Villela et al., 2007; Villela et al., 2013), from freshwater to marine ecosystems, as they are filter feeders and stationary organisms. Moreover, the capacity of bivalves to

* Corresponding author.

E-mail address: fgirardello@yahoo.com.br (F. Girardello).

bioaccumulate toxic compounds determines their participation in the transfer of environmental pollutants to higher trophic levels (Hunt et al., 2003). The exotic organism *Limnoperna fortunei* (golden mussel) is a freshwater bivalve that has been used in biomonitoring environmental conditions in several studies (Iummato et al., 2013; Mariano et al., 2006; Villela et al., 2013). This exotic organism was first introduced in 1998 (Mansur et al., 1999) in Rio Grande do Sul, the southeast state of Brazil. Specimens of *L. fortunei* have wide distribution and can be collected throughout the year, which makes this organism a very useful tool for biomonitoring nanoparticles and a good candidate as a sentinel organism (Girardello et al., 2016; Mariano et al., 2006; Villela et al., 2006; Villela et al., 2007; Villela et al., 2013).

Once nanoparticles are in the aquatic system they will interact with a variety of organisms, promote toxic effects and deregulate cell metabolism at different levels, depending on the concentration and time of exposure. Accumulation of nanoparticles into cells may result in DNA damaging, generation of reactive oxygen species (ROS) and a high affinity for organic and metallic pollutants (Azqueta and Dusinska, 2015; Marisa et al., 2015). The immune system plays an important role in metabolism, as the mediated immunity and phagocytic cells are primary targets of nanoparticle immunotoxicity (Jovanović and Palić, 2012). The haemocytes are the blood cells of the mussels, which responds to a variety of contaminants at *in vitro* and *in vivo* studies (Barmo et al., 2013) and are involved in many functions of the cell; as digestion, metabolite transport, wound and shell repair (Travers et al., 2008). The bivalves organisms have two main haemocytes: hyalinocytes contain few or no granules with round and centered nucleus, and granulocytes present granules and an eccentric, round to ovoid nucleus (Travers et al., 2008). Functionally, both haemocytes can form pseudopodia, aggregate, phagocyte particles and produce reactive oxygen species (Cima et al., 2000).

Reactive oxygen species can cause serious damage to lipids, proteins and deplete enzymatic defenses such as superoxide dismutase and catalase, as well as the non-enzymatic protein-bound sulfhydryl groups (Katsumiti et al., 2014). From an ecotoxicological perspective, it has been demonstrated that the TiO₂-NP induce changes in redox metabolism, altering markers related to biomolecules oxidation (Girardello et al., 2016; Iummato et al., 2013), and enzymatic antioxidant defenses changes in different aquatic organisms such as zebrafish embryos (Faria et al., 2014), marine abalone (Zhu et al., 2011), juvenile carpa (Hao et al., 2009) and marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Canesi et al., 2010b). However, little information related to molecular mechanisms and modulation of enzymatic and non-enzymatic defenses in *L. fortunei* has been reported until now.

The evaluation of the biological impact of TiO₂-NP and the need to understand its ecotoxicological consequence on the aquatic ecosystem is of paramount importance. However, data showing how these nanostructures internalize the cell and elucidate the molecular mechanism in which nanoparticles interacts with cell metabolism is still limited. Therefore, the purpose of this study was to determine the cellular distribution and internalization of TiO₂-NP and the activities of superoxide dismutase and catalase enzymes as well as the non-enzymatic protein sulfhydryl content in golden mussel *L. fortunei*.

2. Material and methods

2.1. Test organisms

Limnoperna fortunei individuals were manually collected in the Itapuã State Park preservation area (RS, Brazil) (S 30°21'25.8", WO 51°02'58.5"), which is a conservation unity protected by the

environmental department of the state government (<http://www.sema.rs.gov.br>, 2015). The mussels and water samples were collected and immediately transported to the laboratory and kept at room temperature, according to the protocol described by Villela et al. (2006). About 100 individuals were placed in each aquarium containing 2 L of Itapuã water and kept under constant aeration at 19 ± 2 °C. The mussels were fed with herbivorous fish blended mixture with Itapuã water every 2 days. All the experiments were carried out after 10 days of acclimation period.

2.2. Titanium dioxide nanoparticles—TiO₂-NP

TiO₂-NP (purity >99.5%) were obtained from Sigma-Aldrich. Prior to exposure, a stock solution was prepared using 1000 µg mL⁻¹ TiO₂-NP (12.52 mM) in ultra-pure water (Milli-Q®) and sonicated (Sonicator USC-1400A UNIQUE) for 30 min before different concentrations of TiO₂-NP solutions were prepared: 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ (0.0125, 0.0626, 0.125 and 0.626 mM TiO₂-NP, respectively) (Girardello et al., 2016). The water was from the collection site of Itapuã State Park (Viamão, RS, Brazil) to mimic the natural environment of the golden mussel. Dispersion of nanoparticles was performed before exposure to mussels through sonication of TiO₂-NP solution for 30 min.

TiO₂-NP showed average size of 20 nm, surface area of 46.26 m² g⁻¹ and the presence of both anatase and rutile phase. As described previously, the TiO₂-NP solutions are unstable, with zeta potentials between -30 mV and 30 mV, present large amounts of organic matter and formation of aggregates with a diameter larger than 500 nm (Girardello et al., 2016). The average dimensions, shape and morphology of TiO₂-NP powder were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) using a JEM JEOL 1200 Ex II, operating at 80 kV, equipped with a CCD camera. The crystalline phase of TiO₂-NP was analyzed by X-ray diffraction (XRD) using the Siemens D500 X-ray Diffractometer and performed in the 2θ range from 20 to 80 with a step size of 0.05, using CuKα (λ = 1.5406) radiation. Surface area was obtained by the method of Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer et al., 1938), by nitrogen adsorption at -196 °C on a Micrometrics Tristar® II 3020 instrument, after pretreatment the sample under high vacuum at 70 °C, for 12 h. Dynamic light scattering (DLS) was performed with a Brookhaven Instruments EMI 9863 equipped with a 35 mW He-Ne laser, 632.8 nm laser diode. The Zeta potential (ZP) measurement was carried out on a Zeta Potential Analyzer Brookhaven Instruments (λ = 660 nm) 31450. The 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP (0.0125, 0.0626, 0.125 and 0.626 mM, respectively) solutions were freshly prepared to evaluate the hydrodynamic size distribution by DLS, the electric charge and stability of dispersion by ZP analysis.

2.3. Exposure to TiO₂-NP

Adult bivalves (2.05 ± 0.17 cm long) were divided into groups of 4 individuals and exposed to 1, 5, 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP (0.0125, 0.0626, 0.125 and 0.626 mM, respectively) for two time points, 2 and 4 h. The control group (untreated) was maintained in Itapuã water for 2 and 4 h. The lower concentrations used in the exposure assays also fell within the range of those observed in ecotoxicity tests using the same types of nanoparticles (Canesi et al., 2010a; Chen et al., 2011; Shukla et al., 2011). Animals were not fed during the exposure periods.

2.4. Analysis by transmission electron microscopy

The transmission electron microscopy (TEM) test was performed using the haemolymph cells of the *L. fortunei*. The haemolymph was extracted from the posterior adductor muscle with a hypodermic needle using a 1 mL syringe while the

Table 1
Sod and Cat activities of golden mussel's soft body in different exposure times and TiO₂-NP concentrations.

TiO ₂ -NP Concentrations	Sod (USod/mg de proteína)		Cat (UCat/mg protein)	
	2h	4h	2h	4h
Control	5.15 ± 0.22 ^a	2.50 ± 0.20 ^a	7.03 ± 0.23 ^a	6.61 ± 0.94 ^a
1 µg mL ⁻¹	1.62 ± 0.19 ^b	2.23 ± 0.08 ^a	6.38 ± 0.73 ^a	4.96 ± 1.00 ^a
5 µg mL ⁻¹	1.13 ± 0.16 ^b	2.22 ± 0.53 ^a	5.23 ± 0.82 ^{ab}	7.84 ± 1.66 ^a
10 µg mL ⁻¹	0.78 ± 0.22 ^b	2.66 ± 0.31 ^a	3.67 ± 0.21 ^b	5.85 ± 0.27 ^a
50 µg mL ⁻¹	1.21 ± 0.66 ^b	1.33 ± 0.76 ^a	4.29 ± 0.18 ^b	5.08 ± 0.97 ^a

Data are presented as the mean ± standard deviation. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the same exposure time. One-way ANOVA and the Tukey's test, $p < 0.05$.

mussels were still alive. The samples preparation was adapted by (Barmo et al., 2013). Haemocytes were fixed in 0.12 M phosphate buffer in distillate water containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, and rinsed three times with 0.1 M phosphate buffer in distillate water. Cells were fixed in 2% osmium tetroxide for 30 min. After, the samples were dehydrated through a graded ethanol series and embedded in epoxy resin (Embed-812 kit) at 60 °C for 72 h. The contrast was obtained with 2% uranyl acetate and lead citrate. Ultrathin sections (about 90 nm) were analyzed with Tecnai G2 T20 FEI transmission electron microscope, operating at 80 kV and equipped with a CCD camera. This microscope has Energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) for elemental analysis.

2.5. Sample preparation for enzymatic activity and protein sulfhydryl content determination

After 2 and 4 h exposure with different TiO₂-NP concentrations, the soft bodies (~1 g) were homogenized in 0.154 M KCl (1:5 w/v) containing protease inhibitor (0.5 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride) and centrifuged at 7200g for 30 min. Sample preparation was adapted from Iummato et al. (2013). Supernatant was used for superoxide dismutase and catalase activities and protein sulfhydryl content determination. The soluble protein content was determined in the supernatants according to Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.6. Superoxide dismutase and catalase activities

Superoxide dismutase (Sod) activity was measured by the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mM L⁻¹ adrenaline (pH 2.0) and 50 mM L⁻¹ glycine (pH 10.2) at 30 °C for 3 min (Bannister and Calabrese, 1987). Results were expressed as USod (units of enzyme activity)/mg protein. One unit is defined by the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%. Catalase (Cat) activity was measured according to the method described by Aebi (1984). The assay determines the rate of H₂O₂ decomposition at 30 °C for 1 min in 240 nm. Results were expressed as UCat/mg of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that decomposes 1 mmol of H₂O₂ in 1 min at pH 7.4. All absorbance were measured in microplate reader (Victor-X3, multilabel counter, PerkinElmer, Finland).

2.7. Protein sulfhydryl content

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB), whose absorption is determined spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results are expressed as mmol of DTNB/mg of protein.

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation (SD) obtained from independent experiments. Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the parametric distribution of data. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Significance was accepted at $p \leq 0.05$. The software SPSS 21.0 was used for all of the statistical analysis.

3. Results

3.1. Analysis of Limnoperna fortunei haemolymph cells by TEM

Images of haemocytes are shown in Fig. 1. TiO₂-NP can penetrate within the haemocytes of golden mussel at different concentrations. Images are representative of control sample without TiO₂-NP exposure (Fig. 1A) in contrast to TiO₂-NP being phagocytosed (Fig. 1B). Images of nanoparticles in contact and damaging the haemocyte membrane indicated by arrows in figure and internalized by haemocytes (Fig. 1C). Furthermore, it is possible to observe autophagosomes (at) with TiO₂-NP within of the haemolymph cell (Fig. 1D). TiO₂-NP exposure at lower concentration levels (1 µg mL⁻¹) did not apparently affect the morphology of the cells (Fig. 1E), but higher concentrations generated aggregates of nanomaterial with evident cell damage and loss of organelle structure (Fig. 1F).

The presence of TiO₂-NP observed inside and outside the haemocytes was confirmed by size and morphology analysis, besides the EDS for elemental analysis (Fig. 2). On the elemental analysis graph, the peaks are related to the presence of titanium. The others peaks present refers to the presence of Cu, Os and Pb. Given that the carrier of slices of haemocytes was a copper network (grid), the percentage of Cu was the highest based on elemental analysis. The presence of osmium (Os) and lead (Pb) on elemental analysis refers to sample fixation and staining processes, respectively.

3.2. Superoxide dismutase and catalase activities

Antioxidant activity of Sod was significantly decreased under all treatments at 2 h exposure, when compared to the control group (Table 1). In relation to Cat enzyme, the antioxidant activity was significantly decreased at 2 h exposure under 10 and 50 µg mL⁻¹ TiO₂-NP exposures, when compared to the control group (Table 1). After 4 h of exposure to TiO₂-NP both Sod and Cat activities showed no statistical significant changes compared to control.

3.3. Protein sulfhydryl content

Protein sulfhydryl content decreased significantly after 2 h TiO₂-NP exposure and no alterations were observed after 4 h of TiO₂-NP treatment (Table 2).

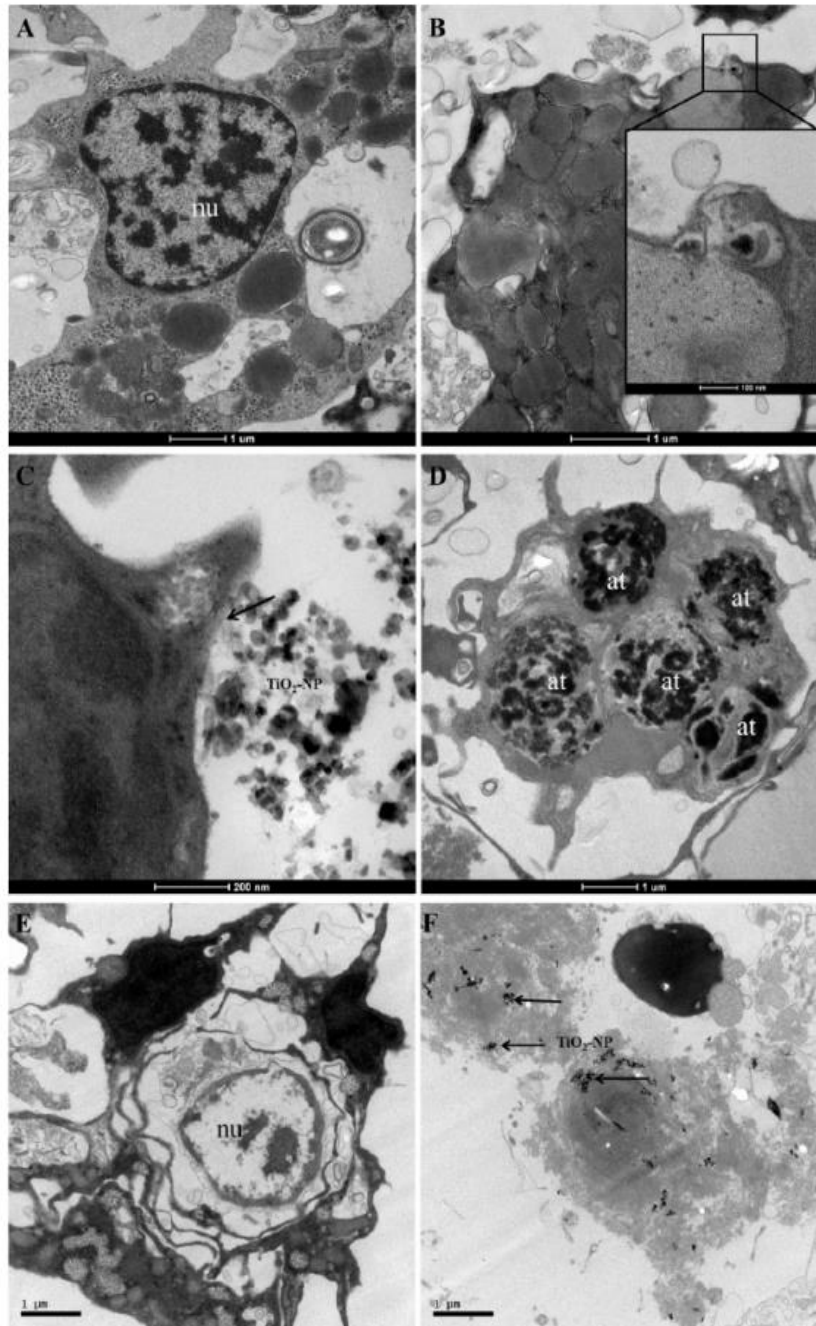


Fig. 1. TEM images of *L. fortunei* haemocytes. (A) Non-treated samples—control (nu: nucleus). (B) TiO₂-NP is phagocytized by haemocytes (1 µg mL⁻¹, 2 h). (C) Close contact of TiO₂-NP with cell surface membrane and internalized by haemocytes (50 µg mL⁻¹, 2 h). (D) TiO₂-NP inside the autophagosomes (at) (50 µg mL⁻¹, 2 h). (E) Low TiO₂-NP concentration in haemocytes showing no morphological alterations (1 µg mL⁻¹, 4 h). (F) High TiO₂-NP concentration and its aggregates (arrows) were in haemocytes; the cells are damaged and no organelles or membranes are visible (50 µg mL⁻¹, 4 h).

4. Discussion

In this study, the images of TEM showed TiO₂-NP internalizing into the haemocytes of the golden mussel in freshwater ecosystem. Additionally, TiO₂-NP can penetrate and be phagocytosed by

haemolymph cells, being able to damage the haemocyte membrane. The internalization of TiO₂-NP in haemocytes depends on the concentration and time in which the organism is exposed and biological effects can vary significantly, most time leading to cell death. Besides nanoparticle composition and solubility, another

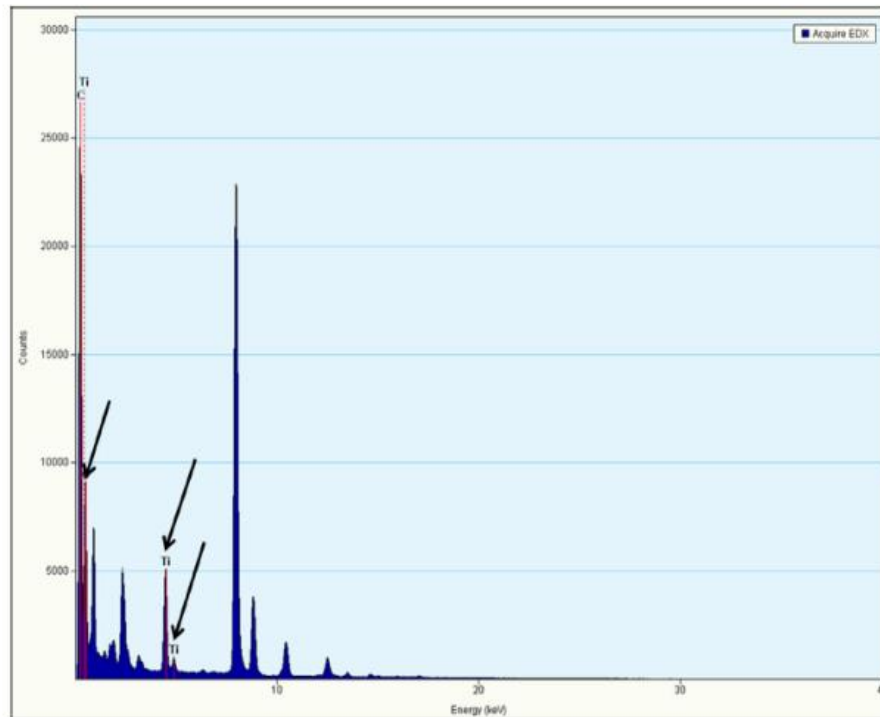


Fig. 2. EDS elemental analysis confirming the presence of titanium in treated sample ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, 2 h), peaks are indicated with arrows. The remaining peaks in figure refer to the presence of others metals as Cu, Os and Pb.

Table 2
Determination of sulphhydryl protein content (non-enzymatic antioxidant defense) in golden mussel's soft body in different exposure times and TiO_2 -NP concentrations.

TiO ₂ -NP Concentrations	sulphhydryl protein (mM DTNB/mg proteina)	
	2h	4h
Control	0.08 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
1 μg mL ⁻¹	0.04 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^{ab}
5 μg mL ⁻¹	0.05 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^{ab}
10 μg mL ⁻¹	0.05 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^{ab}
50 μg mL ⁻¹	0.04 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^{ab}

Data are presented as the mean ± standard deviation. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the same exposure time. One-way ANOVA and the Tukey's test, $p < 0.05$.

main factor for risk assessment of metal oxide nanoparticles is the mode in which this nanomaterial interacts with biological systems (Wang et al., 2010; Wu et al., 2010). The internalization and interaction of a similar TiO_2 -NP with haemocytes can also be observed in haemocytes of the *Ruditapes philippinarum* at marine ecosystem (Marisa et al., 2015). The damage of TiO_2 -NP exposure of membrane cells can be related to an increase of lipid peroxidation, as already related in a previous study of our group (Girardello et al., 2016). The effects of TiO_2 -NP may reflect the ability of the TiO_2 -NP to link to thiol-groups localized in the cell wall proteins, destabilizing the outer membrane (Lapresta-Fernández et al., 2012). The presence of TiO_2 -NP in autophagosomes can indicate induction of cell death, as it is not possible to observe organelles or nucleus of these haemocytes. The large-scale autophagic vacuolization of the cytoplasm and resultant vacuolated appearance is related to a type of cell death (Liu and Levine, 2015).

The TiO_2 -NP exposure to *L. fortunei* induces a redox imbalance in mussel cells, in both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses. The Sod and Cat activities and protein sulphhydryl content decrease after 2 h TiO_2 -NP exposure, and turn back to normal levels after 4 h of TiO_2 -NP exposure. Superoxide dismutase reduces superoxide ion radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2), acting as a first antioxidant defensive system, and therefore suggesting the production of the radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ by TiO_2 -NP (Halliwell and Gutteridge, 2015). Catalase reduces H_2O_2 , generating H_2O and O_2 (Halliwell and Gutteridge, 2015) in order to reduce the deleterious effect of H_2O_2 . It was already described that in juvenile carp a similar TiO_2 -NP exposure induced a decrease in Sod and Cat activities and significant increase in lipid peroxidation levels were observed, suggesting that the fish exposed to TiO_2 -NP presented oxidative stress (Hao et al., 2009). Besides, TiO_2 -NP *in vitro* exposure was able to generate oxidative stress in zebrafish embryos (Faria et al., 2014).

Limnoperna fortunei exposed to TiO_2 -NP exhibited a decreased amount of thiol-containing proteins in comparison to controls. This is consistent with the direct oxidation of thiols by ROS in response to TiO_2 -NP (Tedesco et al., 2010). Thiol-groups are important players in a cell antioxidant defense mechanism used to counteract oxidative stress. The protein sulphhydryl content and the internalization of TiO_2 -NP into haemocytes of golden mussels have not been demonstrated in the previous literature. Therefore, this is the first study to show that sulphhydryl content can be used as a biomarker of antioxidant defense in *L. fortunei*.

The TiO_2 -NP exposure to *L. fortunei* possibly enhanced the ROS production, as showed by Girardello et al. (2016) that can be related to membrane damage of haemocytes observed in MET images and the depletion of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses, which are responsible for the imbalance in the redox metabolism observed in *L. fortunei*. Fig. 3 demonstrates these

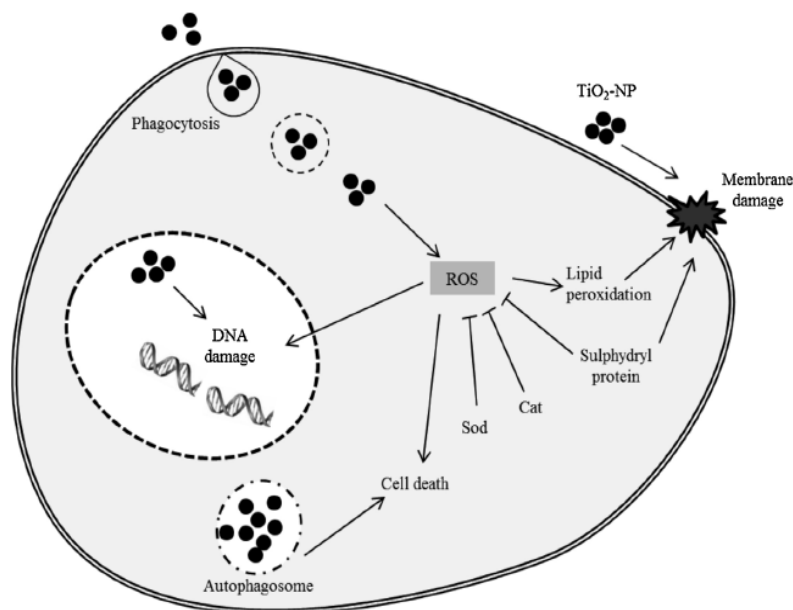


Fig. 3. Illustrative scheme demonstrating the possible molecular mechanisms that can act on *Limnoperna fortunei* cells after TiO₂-NP exposure. TiO₂-NP can be phagocytosed and released into the cytosol. TiO₂-NP penetrates, generate ROS and induce oxidative stress, which may be inhibited by the induction of enzymatic antioxidant defenses by SOD, CAT, and non-enzymatic antioxidant defense by sulphydryl protein content. The TiO₂-NP can also induce lipid peroxidation damaging to the outer cell membrane (Girardello et al., 2016). Autophagosomes with TiO₂-NP within of the cell possible appears as a response to the internalization of these nanoparticles and induce cell death. As a consequence, TiO₂-NP can cause DNA damage directly or indirectly through the induction of oxidative stress, as described by Girardello et al. (2016).

possible consequences of TiO₂-NP in the cell of golden mussel, showing the molecular mechanisms that can act after TiO₂-NP exposure.

5. Conclusions

TiO₂-NP is able to internalize into haemocytes of *L. fortunei* and damage the membrane of the cells, showing that MET represent a good tool to verify the effects of TiO₂-NP in golden mussel cells. Besides, our data showed that Sod and Cat activities and sulphydryl protein content can be used as biomarkers for TiO₂-NP toxicity. The imbalance in redox metabolism by modulation of these defenses after TiO₂-NP exposure demonstrated that this mussel represents a major target for TiO₂-NP toxicity. The results confirm the potential of golden mussel as sentinel organism to TiO₂-NP exposure.

Acknowledgements

The authors would like to thank the LabCEMM of PUCRS and Moema Queiroz Vieira for their assistance in the analysis of MET images, the Conservation Unit Division (Divisão de Unidades de Conservação) of the environmental department of the state government (SEMA-RS) for allowing us to collect samples in Itapuã State Park (RS, Brazil), the funding agencies Fapergs, CAPES and CNPQ for supporting this study.

References

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
 Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141–145.
 Azqueta, A., Dusinska, M., 2015. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Front. Genet.* 6, 239.
 Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279–312.

Barmo, C., et al., 2013. In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 9–18.
 Brunauer, S., et al., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.
 Canesi, L., et al., 2010a. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquat. Toxicol.* 96, 151–158.
 Canesi, L., et al., 2010b. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquat. Toxicol.* 100, 168–177.
 Canesi, L., et al., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar. Environ. Res.* 76, 16–21.
 Canesi, L., et al., 2014. Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 153, 53–65.
 Chen, T.H., et al., 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Pollut. Bull.* 63, 303–308.
 Cima, F., et al., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve: 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 677–693.
 Faria, M., et al., 2014. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* 470–471, 379–389.
 Girardello, F., et al., 2016. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquat. Toxicol.* 170, 223–228.
 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
 Hao, L., et al., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.* 21, 1459–1466.
 Hunt, J., et al., 2003. Bivalve bioaccumulation monitoring results. In: Estuary, S.F. (Ed.), RMP Annual Results 2003. San Francisco Estuary Regional Monitoring Program. San Francisco Estuary, Richmond, CA, pp. 1–17.
 Iummato, M.M., et al., 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 123–129.
 Jovanović, B., Palić, D., 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish—review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat. Toxicol.* 118–119, 141–151.
 Kaida, T., et al., 2004. Optical characteristics of titanium oxide interference film and the film laminated with oxides and their applications for cosmetics. *J. Cosmet. Sci.* 55, 219–220.
 Katsumiti, A., et al., 2014. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 153, 39–52.

- Lapresta-Fernández, A., et al., 2012. Nanocotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends Anal. Chem.* 32, 40–59.
- Liu, Y., Levine, B., 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ.* 22, 367–376.
- Lowry, O.H., et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mansur, M.C.D., et al., 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 7, 3.
- Mariano, B., et al., 2006. Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei*. *Environ. Pollut.* 144, 280–288.
- Marisa, I., et al., 2015. In vitro exposure of haemocytes of the clam *Ruditapes philippinarum* to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: nanoparticle characterisation, effects on phagocytic activity and internalisation of nanoparticles into haemocytes. *Mar. Environ. Res.* 103, 11–17.
- Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.* 32, 967–976.
- Newman, M.D., et al., 2009. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. *J. Am. Acad. Dermatol.* 61, 685–692.
- Oberdorster, G., et al., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839.
- Popov, A.P., et al., 2005. TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38, 2564.
- Shi, H., et al., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 10, 15.
- Shukla, R.K., et al., 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. In Vitro* 25, 231–241.
- Simonet, B.M., Valcárcel, M., 2009. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 17–21.
- Tedesco, S., et al., 2010. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 100, 178–186.
- Travers, M.-A., et al., 2008. Morphologic: cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Villela, I.V., et al., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 605, 78–86.
- Villela, I.V., et al., 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 628, 76–86.
- Villela, I.V., et al., 2013. The use of genetic bioassays to evaluate the environmental quality in a region under the influence of urban waste in guaíba lake basin (Brazil). 2, 12.
- Wang, Z., et al., 2010. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere* 80, 525–529.
- Wu, B., et al., 2010. Comparative eco-toxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure modes. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1484–1489.
- Zhu, X., et al., 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Mar. Pollut. Bull.* 63, 334–338.

Discussão geral

3. DISCUSSÃO GERAL

Nos últimos anos houve um aumento expressivo na produção e utilização de TiO_2 -NP, sendo considerada a NP mais produzida mundialmente (Vale et al., 2016). Esse aumento na demanda de TiO_2 -NP ocorre devido à busca de materiais que apresentassem características e propriedades atrativas, as quais podiam ser encontradas na utilização do material nanoparticulado. Estudos desenvolvidos com esse material colocaram em xeque a utilização do TiO_2 , pois indícios de toxicidade puderam ser evidenciados quando utilizados na escala nanométrica, onde a reatividade do material aumenta em consequência do aumento da sua área superficial (Demir et al., 2015; Shi et al., 2013). Diante disso, uma crescente preocupação vem surgindo com relação aos diferentes aspectos relacionados à sua produção e utilização: quais são os efeitos tóxicos dessa exposição às TiO_2 -NP? Quais são as consequências biológicas? Que tipo de comportamento tem esse material após sua liberação no ambiente? Quais são suas possíveis interações nos diferentes meios a que atingem, tanto a nível de meio ambiente como na saúde humana? Mediante o exposto, destaca-se a importância de se conhecer os reais efeitos das TiO_2 -NP e, assim, desenvolver protocolos que assegurem a sua correta aplicação, utilização e descarte, evitando possíveis riscos à saúde humana e ambiental, inerentes à sua exposição.

A toxicidade das TiO_2 -NP depende de múltiplos fatores que levam em consideração as propriedades físico-químicas das NP e as condições ambientais em que elas se encontram. O tamanho, carga, concentração, estabilidade são características que afetam o comportamento e, conseqüentemente, a toxicidade das TiO_2 -NP (Girardello et al., 2016a; Girardello et al., 2016b; Shi et al., 2013). Uma completa e adequada

caracterização vem se tornando de extrema importância na elucidação do comportamento das NP nos sistemas, possibilitando esclarecer melhor os mecanismos envolvidos e os alvos da toxicidade (Girardello et al., 2016a; Girardello et al., 2016b). Essa identificação da importância da caracterização vem fazendo com que a comunidade científica se volte à padronização e ao aprofundamento de técnicas que esclareçam os modos de ação de TiO₂-NP, possibilitando entender quais propriedades e/ou características são mais ou menos importantes no mecanismo de toxicidade nos sistemas atingidos.

Tendo como finalidade a melhor compreensão dos mecanismos e efeitos da exposição às TiO₂-NP, este trabalho avaliou as características desse material e seu potencial toxicológico em organismos aquáticos, mais especificamente no mexilhão dourado *L. fortunei*, alvos dessa exposição. A caracterização das TiO₂-NP se deu por um conjunto de técnicas que avaliaram suas propriedades físico-químicas, inclusive em solução aquosa, mimetizando o ambiente natural dos mexilhões dourados. A avaliação da toxicidade *in vivo* com o *L. fortunei* envolveu ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, avaliação do estresse oxidativo e determinação das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no organismo sentinela, o mexilhão dourado.

Como demonstrado no **Capítulo 1**, as TiO₂-NP foram capazes de induzir danos do DNA dos hemócitos do mexilhão dourado, avaliados através do ensaio cometa. Além disso, danos a lipídios e proteínas também foram verificados com a exposição às TiO₂-NP. No entanto, a mutagenicidade, avaliada pelo teste de micronúcleos, não foi evidenciada. As características físico-químicas das TiO₂-NP foram avaliadas com as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, difração de

raios X, análise da área superficial, espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta. O conjunto de resultados auxiliou na elucidação da toxicidade das TiO₂-NP no *L. fortunei*.

O **Capítulo 2** abordou a capacidade de internalização das TiO₂-NP, avaliada através das imagens obtidas dos hemócitos do mexilhão dourado, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, foi avaliada a modulação das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas do *L. fortunei*. A entrada das TiO₂-NP nas células e suas consequências foram discutidas com base nos resultados das análises da atividade das defesas antioxidantes, as quais diminuíram logo após a exposição do mexilhão dourado às TiO₂-NP.

Nessa discussão vale destacar a importância da caracterização realizada das TiO₂-NP nos resultados de toxicidade apresentados neste trabalho. A agregação ocorre quando as TiO₂-NP estão presentes no meio aquoso, visto que os ensaios utilizaram a água coletada no Parque estadual de Itapuã. Essa água contém matéria orgânica (Tabela 1, Capítulo 1) com a qual as TiO₂-NP podem complexar. O material particulado nos ambientes aquáticos raramente existe como partículas individuais, pois processos físicos e biológicos operam para agregar partículas em grandes massas (Ward e Kach, 2009). No compartimento aquático, tanto na água como nos sedimentos, as NP podem se misturar e interagir com outros componentes, não somente com a matéria orgânica dissolvida e particulada, mas também com contaminantes orgânicos hidrofóbicos e íons inorgânicos (Canesi et al., 2015). A agregação das NP é um dos processos mais importantes para compreender e prever o transporte no ambiente e seus potenciais efeitos sobre os organismos alvo. O estado de agregação das NP e sua distribuição de tamanho de partículas determinam tanto o seu transporte nos compartimentos ambientais quanto sua biodisponibilidade (Adam et al., 2016). A agregação das

TiO₂-NP possivelmente irá aumentar a sua biodisponibilidade aos moluscos bivalves, uma vez que se alimentam de suspensões através do seu mecanismo de filtração (Canesi et al., 2012).

O processo de filtração permite que os mexilhões possam se alimentar a partir das suspensões aquosas em que se encontram, filtrando grandes volumes de água e podendo acumular substâncias químicas nos seus tecidos (Canesi et al., 2012). Segundo estudo de Sylvester et al. (2005) as taxas de filtração do *L. fortunei* variam de 125 a 350 mL ind⁻¹ h⁻¹, estando entre as mais elevadas já reportadas para bivalves filtradores. O mexilhão dourado direciona as partículas filtradas em correntes de aceitação, para serem ingeridas, ou correntes de rejeição para serem expelidas. Uma vez ingeridas, elas podem ser transportadas pelo sistema digestivo ou, se rejeitadas, são eliminadas na forma de pseudofeces. Os agregados de NP podem ser quebrados ou divididos pela ação dos cílios nas brânquias e palpos labiais e as partículas serem ingeridas (Joubert et al., 2013; Ward e Kach, 2009). As moléculas absorvidas na digestão no estômago podem ser armazenadas ou transferidas para o sangue, chamado de hemolinfa (Ruppert et al., 2004). No caso de NP, estudos *in vivo* afirmam sua capacidade de afetar os hemócitos devido ao seu potencial de serem transferidas do sistema digestivo para a hemolinfa e hemócitos circulantes. Os hemócitos somente irão capturar NP após estas atravessarem o epitélio dos túbulos da glândula digestiva, tendo importante papel na avaliação do impacto das NP (Canesi et al., 2012; Rocha et al., 2015). Devido a estas características, os moluscos bivalves representam um grupo alvo único para toxicologia de NP e, em especial os mexilhões, por representar um organismo modelo adequado na caracterização do potencial impacto das NP (Canesi et al., 2012).

Os hemócitos do mexilhão dourado utilizados em nosso trabalho puderam ser analisados pela microscopia eletrônica de transmissão, onde se comprovou a presença das TiO₂-NP internalizadas nestas células, a qual apresentou algumas alterações na membrana (Capítulo 2). A internalização e interação de TiO₂-NP com hemócitos de outros organismos também foram observadas com o molusco *Ruditapes philippinarum*, de ambiente marinho (Marisa et al., 2015). A comprovação de TiO₂-NP presentes nos hemócitos indica a captura desse material pelo mexilhão dourado durante seu processo de filtração e a capacidade das TiO₂-NP serem transferidas do sistema digestivo para o circulatório do organismo, a hemolinfa contendo os hemócitos. Os hemócitos são células do sangue dos bivalves que se assemelham, estrutura e funcionalmente, aos macrófagos/monócitos dos mamíferos, e são responsáveis pela resposta imune inata nestes organismos, mediada através de fagocitose e várias reações citotóxicas (Canesi et al., 2012). A fagocitose pode ser visualizada nas imagens de MET obtidas neste trabalho com as células da hemolinfa após exposição do mexilhão dourado às TiO₂-NP, onde é possível identificar a captura de TiO₂-NP pela célula (Figura 1, Capítulo 2).

As NP podem atuar nas células dos mexilhões através da geração de estresse oxidativo e danificar proteínas, membrana e o DNA das células. A citotoxicidade das NP em mexilhões está direta ou indiretamente mediada pelas ERO (Rocha et al., 2015). Katsumiti et al., (2014) apontam a alta sensibilidade dos hemócitos à exposição ao Cádmio e sua forma nanoparticulada, devido à alta produção de ERO identificada nessas células (Katsumiti et al., 2014).

O potencial efeito das TiO₂-NP na molécula do DNA dos hemócitos do *L. fortunei* se deve a sua capacidade de internalização nas células, onde também podem

acarretar danos à outras biomoléculas, conforme esquema ilustrativo demonstrado na Figura 2 do Capítulo 2. Adicionalmente, esses danos podem ser causados pela indução de estresse oxidativo, ocasionado pelo desequilíbrio entre a geração de ERO e a capacidade antioxidante, enzimática e não enzimática, de defesa das células. A ausência de mutagenicidade nos hemócitos, avaliada pelo teste de micronúcleos (Figura 4, Capítulo 1), indica que as TiO₂-NP não foram capazes de induzir mutações cromossômicas (Demir et al., 2015; Prasad et al., 2013).

Marcadores de danos oxidativo a lipídios e proteínas nas células do *L. fortunei* (Capítulo 1) indicam que as TiO₂-NP foram capazes de induzir ERO, levando à oxidação dessas biomoléculas nas células. A peroxidação lipídica pode ser definida como a deterioração oxidativa da membrana celular lipídica e tem sido extensivamente utilizada como um marcador de estresse oxidativo, podendo danificar as células e desencadear o processo de apoptose (Khan et al., 2015). Conforme apresentado na Figura 2, do Capítulo 2, as TiO₂-NP podem entrar nas células por fagocitose e gerar as ERO. Estas, por sua vez, podem acarretar danos ao DNA, lipídios e proteínas (Capítulo 1) e modular as defesas antioxidantes das células (Capítulo 2). Alterações em lipídios e proteínas podem estar relacionadas com os danos causados na membrana das células do *L. fortunei*. Além disso, a presença de autofagossomas contendo TiO₂-NP ocorre em resposta à internalização dessas NP e podem indicar que houve o reconhecimento das TiO₂-NP pelas células na tentativa de isolar/expelir o material.

O estresse oxidativo gerado nas células vem sendo citado como principal indutor de danos ao DNA. Tem sido demonstrado que há muitas correlações entre o nível de ERO geradas e o grau de danos ao DNA induzidos por TiO₂-NP, sugerindo a

coexistência de diferentes mecanismos que abrangem a genotoxicidade de TiO₂-NP (Canesi et al., 2014).

A sequência de reações celulares em resposta à presença de TiO₂-NP demonstra os possíveis mecanismos de ação da toxicidade desse material e seu real potencial de atingir as células, principalmente afetando a molécula de DNA. Os resultados apresentados com relação à indução de danos do DNA, danos oxidativos a lipídios e proteínas e interferência na atividade antioxidante das células foram dose independentes. A formação dos aglomerados pode tornar as TiO₂-NP menos biodisponíveis a nível celular. Quando os agregados se tornam muito grandes para o transporte pelas membranas, a captura pode ser evitada, enquanto a dissolução parcial, a qual leva a partículas menores, irá facilitar seu transporte celular (Vale et al., 2016).

Diante disso, é considerado que a caracterização das TiO₂-NP não pode somente se basear da distribuição do tamanho das NP quando a agregação é a transformação mais importante que ocorre com as TiO₂-NP (Vale et al., 2016). Considerando a possibilidade de agregação das TiO₂-NP e as interações que ocorrem com o meio em que se encontram, os resultados levam a uma interpretação mais fidedigna sobre a toxicidade avaliada. Além disso, a avaliação do impacto biológico das TiO₂-NP e a necessidade de entender seu mecanismo ecotoxicológico nos sistemas aquáticos representam aspectos importantes a serem considerados.

A realização deste trabalho contribui para o conhecimento dos riscos da exposição dos mexilhões dourados às TiO₂-NP, como representante alvo dos organismos aquáticos, local de destinação final desse material. Os efeitos toxicológicos das TiO₂-NP no *L. fortunei* e os possíveis mecanismos de toxicidade a nível celular

confirmaram o uso deste mexilhão como um apropriado organismo bioindicador de exposição às TiO₂-NP.

Conclusões

4. CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permite concluir que as propriedades das TiO₂-NP são afetadas pelo meio em que se encontram, destacando a importância da detecção destas matérias no ambiente onde ocorre sua liberação. As características das TiO₂-NP determinam as interações possíveis no compartimento aquático e a capacidade de serem capturadas pelos hemócitos do *Limnoperna fortunei*. As TiO₂-NP afetam toxicologicamente o mexilhão dourado, causando genotoxicidade e alterações no metabolismo redox nas células desses animais, confirmando sua utilização como um organismo biomonitor apropriado na exposição às NP e no biomonitoramento de NP em efluentes.

Este trabalho permitiu obter as seguintes conclusões específicas:

- As TiO₂-NP apresentaram grande área superficial e tendência à aglomeração quando inseridas em meio aquoso, constituído pela água coletada no Parque Estadual de Itapuã.
- O ensaio cometa mostrou que TiO₂-NP causam danos no DNA dos hemócitos do mexilhão dourado.
- As TiO₂-NP não foram capazes de induzir a formação de micronúcleos nos hemócitos do *L. fortunei*.
- A exposição do mexilhão dourado às TiO₂-NP induziu danos oxidativos a lipídios e proteínas nas células desse organismo.
- As TiO₂-NP foram internalizadas nos hemócitos dos mexilhões dourados expostos e causaram alterações na membrana celular das células.

- Após exposição do *L. fortunei* às TiO₂-NP, observou-se redução da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.
- A defesa antioxidante não enzimática, avaliada pelo conteúdo sulfidril de proteínas, foi diminuída nas células do mexilhão dourado após sua exposição às TiO₂-NP.
- Os efeitos evidenciados com a exposição *in vivo* do *L. fortunei* às TiO₂-NP confirmam a utilização dos biomarcadores de estresse oxidativo e genotoxicidade na avaliação da toxicidade de TiO₂-NP.
- O *Limnoperna fortunei* se mostrou um apropriado organismo bioindicador da exposição às TiO₂-NP.

Perspectivas

5. PERSPECTIVAS

Para uma melhor compreensão dos efeitos gerados pela exposição do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei*, seria de grande relevância a avaliação dos seguintes aspectos:

- Utilizar o ensaio cometa enzimático (endonucleases) nas células da hemolinfa do mexilhão dourado *L. fortunei* após sua exposição às TiO₂-NP;
- Verificar a presença de TiO₂-NP nas células, utilizando a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES);
- Testar e avaliar *in vitro* a exposição da hemolinfa às TiO₂-NP;
- Avaliar outros marcadores de estresse oxidativo e produção de ERO (glutathiona, tioredoxinas, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase);
- Determinar a composição elementar das amostras utilizando a técnica de Emissão de Raios X Induzida por Partículas (micro PIXE);
- Testar o mexilhão dourado *L. fortunei* como bioindicador de efluentes contendo nanopartículas.

Referências bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, V., et al., 2016. Aggregation behaviour of TiO₂ nanoparticles in natural river water. *Journal of Nanoparticle Research*. 18, 1-11.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105, 121-6.
- Aksenov, M. Y., Markesbery, W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 302, 141-5.
- Al-Subiai, S. N., et al., 2012. Merging nano-genotoxicology with eco-genotoxicology: An integrated approach to determine interactive genotoxic and sub-lethal toxic effects of C60 fullerenes and fluoranthene in marine mussels, *Mytilus* sp. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 745, 92-103.
- Azqueta, A., Dusinska, M., 2015. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. *Front Genet*. 6, 239.
- Bannister, J. V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 32, 279-312.
- Barmo, C., et al., 2013. In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*. 132-133, 9-18.
- Benassi-Evans, B., Fenech, M., 2011. Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell lines. *Mutagenesis*. 26, 421-9.
- Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 7, 1125-37.
- Bonassi, S., et al., 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*. 26, 93-100.
- Canesi, L., et al., 2015. Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe? *Marine Environmental Research*. 111, 128-134.

- Canesi, L., et al., 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar Environ Res.* 76, 16-21.
- Canesi, L., et al., 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂). *Aquat Toxicol.* 100, 168-77.
- Canesi, L., et al., 2014. Interactive effects of n-TiO₂ and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 153, 53-65.
- Carmona, E. R., et al., 2015. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 778, 12-21.
- Carocho, M., Ferreira, I. C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51, 15-25.
- Chen, T., et al., 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis.* 22, 95-104.
- Chen, X., Selloni, A., 2014. Introduction: titanium dioxide (TiO₂) nanomaterials. *Chem Rev.* 114, 9281-2.
- Cima, F., et al., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish & Shellfish Immunology.* 10, 677-693.
- Clemente, Z., et al., 2014. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. *Aquatic Toxicology.* 147, 129-139.
- Darrigran, G., Pastorino, G., The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve *Limnoperna fortunei* (*Mytilidae*) in South America. Vol. 38. *The Veliger*, 1995, pp. 171-175.
- Demir, E., et al., 2015. Genotoxic and cell-transforming effects of titanium dioxide nanoparticles. *Environ Res.* 136, 300-8.

- Denicola, A., Radi, R., 2005. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology*. 208, 273-88.
- Doak, S. H., et al., 2012. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 745, 104-111.
- Donner, E. M., et al., 2016. In vivo micronucleus studies with 6 titanium dioxide materials (3 pigment-grade & 3 nanoscale) in orally-exposed rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 74, 64-74.
- Elsaesser, A., Howard, C. V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, 129-137.
- Faria, M., et al., 2014. Oxidative stress effects of titanium dioxide nanoparticle aggregates in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*. 470-471, 379-389.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 455, 81-95.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2, 1084-104.
- Ferrari, C. K., et al., 2011. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 59, 441-8.
- Frenzilli, G., et al., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 681, 80-92.
- Giarratano, E., et al., 2014. Biomarkers of environmental stress in gills of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* (Nuevo Gulf, Northern Patagonia). *Ecotoxicol Environ Saf*. 107, 111-9.
- Girardello, F., et al., 2016a. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquatic Toxicology*. 170, 223-228.

- Girardello, F., et al., 2016b. Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Aquatic Toxicology*. 176, 190-196.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hao, L., et al., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Environmental Sciences*. 21, 1459-1466.
- Hossain, F., et al., 2014. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives. *Science of The Total Environment*. 466–467, 1047-1059.
- Hunt, J., et al., Bivalve bioaccumulation monitoring results. In: S. F. Estuary, (Ed.), *RMP Annual Results 2003*. San Francisco Estuary Regional Monitoring Program. San Francisco Estuary, Richmond, CA, 2003, pp. 1-17.
- IARC, Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of high-priority IARC carcinogens., 2009.
- Iummato, M. M., et al., 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95, 123-129.
- Jones, C. F., Grainger, D. W., 2009. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61, 438-456.
- Joubert, Y., et al., 2013. Subcellular localization of gold nanoparticles in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana* after exposure through the water. *Gold Bulletin*. 46, 47-56.
- Jovanović, B., Palić, D., 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish—Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquatic Toxicology*. 118–119, 141-151.

- Karlsson, H., 2010. The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398.
- Katsumiti, A., et al., 2014. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 153, 39-52.
- Khan, M., et al., 2015. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Reports*. 2, 765-774.
- Klobučar, G. I. V., et al., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*. 64, 15-23.
- Levine, R. L., et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186, 464-78.
- Li, F., et al., 2015. Toxicity of nano-TiO₂ on algae and the site of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*. 158, 1-13.
- Mansur, M. C. D., et al., 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*. 7, 3.
- Mansur, M. C. D., et al., 2003. Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia*. 20, 75-84.
- Mariano, B., et al., 2006. Evaluation of a biomarker of Cd(II) exposure on *Limnoperna fortunei*. *Environ Pollut*. 144, 280-8.
- Marisa, I., et al., 2015. In vitro exposure of haemocytes of the clam *Ruditapes philippinarum* to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: Nanoparticle characterisation, effects on phagocytic activity and internalisation of nanoparticles into haemocytes. *Marine Environmental Research*. 103, 11-17.
- Montes, M. O., et al., 2012. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder. *Journal of Hazardous Materials*. 225–226, 139-145.

- Moore, M. N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*. 32, 967-976.
- Nigro, M., et al., 2015. n-TiO₂ and CdCl₂ co-exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium: Genomic, DNA and chromosomal damage evaluation in the marine fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*. 168, 72-77.
- Oberdorster, G., et al., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 113, 823-39.
- Parolini, M., et al., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cytogenotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. 79, 489-98.
- Paschoalino, M. P., et al., 2010. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*. 33, 421-430.
- Patetsini, E., et al., 2013. Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquat Toxicol*. 126, 338-45.
- Pfuhler, S., et al., 2013. Genotoxicity of nanomaterials: refining strategies and tests for hazard identification. *Environ Mol Mutagen*. 54, 229-39.
- Prasad, R. Y., et al., 2013. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano*. 7, 1929-42.
- Reis, É. d. M., et al., 2015. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test. *Food and Chemical Toxicology*. 84, 55-63.
- Rocco, L., et al., 2015. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 113, 223-230.
- Rocha, T. L., et al., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Marine Environmental Research*. 111, 74-88.

- Ruppert, E. E., et al., 2004. *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*. Brooks/Cole, California.
- Schaumann, G. E., et al., 2015. Understanding the fate and biological effects of Ag- and TiO₂-nanoparticles in the environment: The quest for advanced analytics and interdisciplinary concepts. *Science of The Total Environment*. 535, 3-19.
- Shi, H., et al., 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 10, 15.
- Simonet, B. M., Valcárcel, M., 2009. Monitoring nanoparticles in the environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 393, 17-21.
- Sycheva, L. P., et al., 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 726, 8-14.
- Sylvester, F., et al., 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of Size and Temperature. *Hydrobiologia*. 534, 71-80.
- Thomas, P., et al., 2009. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat. Protocols*. 4, 825-837.
- Travers, M.-A., et al., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 24, 400-411.
- Umegaki, K., Fenech, M., 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis*. 15, 261-9.
- Vale, G., et al., 2016. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment- biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology*. 170, 162-174.
- Villela, I. V., et al., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 605, 78-86.
- Villela, I. V., et al., 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region

- samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 628, 76-86.
- Villela, I. V., et al., 2013. The use of genetic bioassays to evaluate the environmental quality in a region under the influence of urban waste in guaíba lake basin (Brazil). 2, 12.
- Ward, J. E., Kach, D. J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar Environ Res*. 68, 137-42.
- Xie, J., et al., 2014. Evaluation of a dithiocarbamate derivative as a model of thiol oxidative stress in H9c2 rat cardiomyocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 70, 214-222.
- Xu, M., et al., 2015. Growth, reproduction, and attachment of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in water diversion projects. *Acta Ecologica Sinica*. 35, 70-75.
- Yunus, I. S., et al., 2012. Nanotechnologies in water and air pollution treatment. *Environmental Technology Reviews*. 1, 136-148.
- Zhu, X., et al., 2011. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Mar Pollut Bull*. 63, 334-8.

Anexo

7. ANEXO

***CURRÍCULO LATTES* RESUMIDO**



Francine Girardello

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9931561230599107>

Última atualização do currículo em 03/05/2016

Resumo informado pelo autor

Realizou a graduação em Licenciatura (2007) e Bacharelado (2006) em Ciências Biológicas pela Universidade de Caxias do Sul, onde também seguiu com o Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, concluído em 2011. Em março de 2012 deu início ao Doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul, na área de Genética Toxicológica.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Francine Girardello
Filiação José Alceu Girardello e Rose Carla Girardello
Nascimento 13/04/1984 - Ponta Grossa/PR - Brasil
Carteira de Identidade 9069189695 SSP - RS - 09/06/2011
CPF 002.397.870-80

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Biotecnologia
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
 Título: Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*)
 Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
- 2009 - 2011** Mestrado em Materiais.
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
 Título: Utilização de um adsorvente natural para remoção de pireno em meio aquoso., Ano de obtenção: 2011
 Orientador: Marcelo Giovanela e Andreia Neves Fernandes
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2002 - 2007** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2002 - 2006** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
 Título: Determinação do número de trinucleotídeos CAG do gene do receptor de andrógeno: Padronização da técnica e avaliação do número de repetições CAG em homens férteis da região de Caxias do Sul
 Orientador: Jovana Mandelli

Formação complementar

- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Metodologias de estudo de interação de moléculas com o DNA: Cometa. (Carga horária: 8h).
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Interpretação dos Requisitos da ISO 14001:2004. (Carga horária: 12h).
 Câmara de Indústria, Comércio e Serviços de Caxias do Sul, CIC, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Identificação Botânica Ênfase Elaboração de Laudos. (Carga horária: 40h).
 Instituto Ambiental Ceres, IAC, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Licenciamento Municipal de Flora. (Carga horária: 20h).
 Escola de Gestão Pública, EGP, Brasil
- 2008 - 2008** Licenciamento Ambiental. (Carga horária: 16h).
 Consultoria e Assessoria em Políticas Públicas, CAPP, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Formação Continuada. (Carga horária: 4h).
 Prefeitura Municipal de São Marcos, PMSM, Brasil
- 2006 - 2006** Fórum Itinerante do Meio Ambiente. (Carga horária: 6h).
 Fundação Estadual de Proteção do Meio Ambiente, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Atualização em Terapias Gênica e Celular. (Carga horária: 15h).
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Formação Continuada. (Carga horária: 4h).
 Prefeitura Municipal de São Marcos, PMSM, Brasil
- 2004 - 2004** XIX Seminário de Técnicas Radiológicas. (Carga horária: 6h).
 Sindicato dos Técnicos e Auxiliares em Radiologia do Estado do RS, SINTARGS, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Cupins e brocas: identific., diagnóst. e controle. (Carga horária: 44h).
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em OGM (organismos geneticamente modificados). (Carga horária: 5h).
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Perspectivas da Profissão Biólogo. (Carga horária: 2h).
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

-
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em Recursos Genéticos Vegetais. (Carga horária: 56h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2003 - 2003 A evolução da Araucariaceae. (Carga horária: 2h).
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em IV Seminário Internacional de Empreendedorismo. (Carga horária: 12h).
Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Hemoglobinopatias. (Carga horária: 4h).
Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de Caxias do Sul - UCS

Atividades

08/2004 - 04/2005 Estágio, Instituto de Biotecnologia

*Estágio:
Atividades no Laboratório de Diagnóstico Molecular*

06/2003 - 02/2004 Estágio, Instituto de Biotecnologia

*Estágio:
Atividades no Laboratório de controle biológico de insetos*

Revisor de periódico

1. Spectroscopy Letters (Print)




Vínculo

2013 - Atual Regime: Parcial


Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  [DOI](#) GIRARDELLO, FRANCINE; LEITE, CAMILA CUSTÓDIO; BRANCO, CATIA SANTOS; ROESCH-ELY, MARIANA; FERNANDES, ANDREIA NEVES; SALVADOR, MIRIAN; HENRIQUES, JOÃO ANTONIO PEGAS
Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles. *Aquatic Toxicology*. [JCB](#), v.176, p.190 - 196, 2016.
2.  [DOI](#) GIRARDELLO, FRANCINE; CUSTÓDIO LEITE, CAMILA; VIANNA VILLELA, IZABEL; DA SILVA MACHADO, MIRIANA; LUIZ MENDES JUCHEM, ANDRÉ; ROESCH-ELY, MARIANA; NEVES FERNANDES, ANDREIA; SALVADOR, MIRIAN; ANTONIO PEGAS HENRIQUES, JOÃO
Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquatic Toxicology*. [JCB](#), v.170, p.223 - 228, 2016.
3.  [DOI](#) GIRARDELLO, F.; GUÉGAN, R.; ESTEVES, V. I.; BAUMVOL, I. J. R.; SIERRA, M. M. D.; CRESPO, J. S.; FERNANDES, A. N.; GIOVANOLA, M.
Characterization of Brazilian Peat Samples by Applying a Multimethod Approach. *Spectroscopy Letters (Online)*. [JCB](#), v.46, p.201 - 210, 2013.

Capítulos de livros publicados

1.  [DOI](#) **Andraia N. Fernandes**; Francine Girardello; Valdemar Inocêncio Esteves; Maria M. D. Sierra; **Marcelo Giovanela**
Structure and Properties of Subtropical Brazilian Peat Samples In: Peat: Formation, Uses and Biological Effects. 1 ed. New York : Nova Publishers, 2012, p. 124-142.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. F. Girardello; **Marcelo Giovanela**; **Andraia N. Fernandes**
Parâmetros de equilíbrio, cinéticos e termodinâmicos de adsorção do pireno em amostras de turfa. In: 9º Encontro Brasileiro sobre Adsorção e 1º Simpósio Ibero-Americano sobre Adsorção, 2012, Recife. 9º Encontro Brasileiro sobre Adsorção e 1º Simpósio Ibero-Americano sobre Adsorção. , 2012. p.1 - 5
2. F. Girardello; ANTUNES, M. T.; **Andraia N. Fernandes**; **Marcelo Giovanela**
Caracterização química e espectroscópica de amostras de turfa brasileiras In: XIII Congresso Brasileiro de Geoquímica e III Simpósio de Geoquímica dos Países do Mercosul, 2011, Gramado. XIII Congresso Brasileiro de Geoquímica e III Simpósio de Geoquímica dos Países do Mercosul. , 2011. p.1 - 4
3. Francine Girardello; **Marcelo Giovanela**; **Andraia N. Fernandes**
Avaliação das características físico-químicas de turfas, antes e após o tratamento ácido, como uma alternativa para remoção de poluentes emergentes. In: VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2009, Pelotas - RS. VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas. , 2009.
4. Francine Girardello; **Andraia N. Fernandes**; **Marcelo Giovanela**; Valdemar Inocêncio Esteves; Maria M. D. Sierra
Avaliação das propriedades espectrais de turfas e de solos após a extração de suas substâncias húmicas. In: VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2009, Pelotas - RS. VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. STUMPP, Eugen; RECH, Vânia; SOARES, Rosadilla Araújo; GIRARDELLO, Francine; TAUSENFREUND, Luiz H; VARGAS, Lúcia Rosane Bertholdo; BARROS, N. M.; SATTLER, Miguel Aloisio; GIRARDELLO, F.
Avaliação da sustentabilidade e eficiência de tratamentos alternativos para preservação de madeira de florestas plantadas no RS In: 56ª Reunião Anual da SBPC
Avaliação da sustentabilidade e eficiência de tratamentos alternativos para preservação de madeira de florestas plantadas no RS. , 2004.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)



1. F. Girardello; CUSTÓDIO LEITE, CAMILA; VIANNA VILLELA, IZABEL; DA SILVA MACHADO, MIRIANA; ROESCH-ELY, MARIANA; **Andreia N. Fernandes**; SALVADOR, M.; ANTONIO PÉGAS HENRIQUES, JOÃO
GENOTOXICITY EVALUATION OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES IN THE GOLDEN MUSSEL
Limnoperna fortunei In: 1 Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2014, Porto Alegre.
1 Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology. , 2014.
2. F. Girardello; **Marcelo Giovanela**; **Andreia N. Fernandes**
Utilização de turfa para remoção de pireno em meio aquoso In: 16º Congresso Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.
16º Congresso Nacional de Química Analítica. , 2011.

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1.  
Camila Custódio Leite. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ UTILIZANDO O MEXILHÃO DOURADO Limnoperna fortunei (Dunker, 1857). 2014. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade de Caxias do Sul

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) XII CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL, 2016. (Congresso)
TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES INDUCES REDOX IMBALANCE IN THE GOLDEN MUSSEL
Limnoperna fortunei.
2. III Simpósio de Nanobiotecnologia e suas aplicações, 2015. (Simpósio)
3. IV Workshop sobre Produtos Naturais, 2014. (Outra)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) Toxi-Latin 2014, 2014. (Congresso)
Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles in the Golden mussel Limnoperna fortunei.
5. Toxi-Latin 2014, 2014. (Congresso)
6. HUMN and HUMNxl Workshop, 2013. (Outra)
7. I Biotechnology Workshop: focus on health and disease, 2013. (Seminário)
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) 9º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO E 1º SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO SOBRE ADSORÇÃO, 2012. (Simpósio)
PARÂMETROS DE EQUILÍBRIO, CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DE ADSORÇÃO DO PIRENO EM AMOSTRAS DE TURFA.
9. II SIMPÓSIO BRASIL-CANADÁ SOBRE NANOTOXICOLOGIA, 2012. (Simpósio)
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2011. (Encontro)
Characterization of humic acids extracted from sediments of a subtropical microbasin.
11. IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2011. (Encontro)
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) IX Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2011. (Encontro)
Avaliação do potencial de adsorção de turfas brasileiras frente ao contaminante pireno..
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIII Congresso Brasileiro de Geoquímica e III Simpósio de Geoquímica de Países do Mercosul, 2011. (Congresso)
Caracterização química e espectroscópica de amostras de turfa brasileiras.
14. Materials Characterization using Advanced Thermal Analysis Techniques and Calorimetry, 2010. (Seminário)
15. VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2009. (Encontro)
16. Apresentação de Poster / Painel no(a) VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2009. (Encontro)
Avaliação das propriedades espectrais de turfas e de solos após a extração de suas substâncias húmicas..
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) VIII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, 2009. (Encontro)
Avaliação das características físico-químicas de turfas, antes e após o tratamento ácido, como uma alternativa para a remoção de poluentes emergentes..
18. 2º ENCONTRO GAÚCHO DE GENÉTICA, BIOLOGIA MOLECULAR E SAÚDE, 2004. (Encontro)
19. IV Seminário Internacional de Empreendedorismo, I Seminário da Rede Hidro - RS e I Fórum de Inovação Tecnológica, 2003. (Seminário)