

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Toxicologia

Desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando  
o crustáceo marinho *Parhyale hawaiiensis*

Amanda dos Santos

Tese para obtenção do Título de Doutor  
Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo  
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Toxicologia

Desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando  
o crustáceo marinho *Parhyale hawaiensis*

Amanda dos Santos

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018, de 13/10/2011

Tese para obtenção do Título de Doutor  
Orientadora: Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d722d dos Santos, Amanda  
Desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando o crustáceo marinho *Parhyale hawaiensis* / Amanda dos Santos. - São Paulo, 2022.  
88 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Umbuzeiro, Gisela de Aragão

1. Anfípode. 2. Sobrevivência. 3. Reprodução. 4. Crescimento. 5. Hemócitos. I. T. II. Umbuzeiro, Gisela de Aragão, orientador.

Amanda dos Santos

Desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando  
o crustáceo marinho *Parhyale hawaiiensis*

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de Doutor

---

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro (UNICAMP, FT e USP, FCF)  
orientadora/presidente

---

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira (UNIFESP, *Campus* Baixada Santista)  
1o. examinador

---

Prof. Dr. Pedro Manuel Brôa Costa (Universidade Nova De Lisboa, FCT)  
2o. examinador

---

Prof. Dr. Lucas Buruaem Moreira (UNIFESP, *Campus* Baixada Santista)  
3o. examinador

São Paulo, 21 de junho de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ana e Moacir**, que romperam os padrões sociais, e que mesmo não tendo acesso à educação de qualidade e oportunidades, sempre entenderam a importância da educação e da ciência, e me incentivaram a ser dedicada aos estudos e me apoiaram incondicionalmente na minha vida acadêmica,

À minha tia **Juceni** (*in memoriam*), que partiu precocemente devido a influência de indivíduos dispostos a ludibriar uma pessoa debilitada, utilizando de delírios religiosos de grandeza e negacionismo,

E à todas as **vítimas da COVID-19** que tiveram suas vidas negligenciadas por governos negacionistas, que postergaram à adesão de medidas de proteção e aquisição de vacinas.



## Agradecimentos

Agradeço à Deus, por me permitir viver nesse mundo, por me guiar e dar forças para vencer as lutas diárias, e por colocar na minha vida todas as pessoas que irei agradecer neste texto.

Aos meus pais, Ana e Moacir, por nunca terem medido esforços para me conceder as melhores oportunidades de educação que puderam proporcionar, e por todo o apoio, amor, carinho, incentivo e compreensão dados a mim em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã, Juliana, por todo apoio, amor, carinho, companheirismo e pelo exemplo de mulher íntegra que é. Ao meu cunhado Daniel, por todo apoio, incentivo e carinho. Sei que vocês não mediram esforços para me ajudar ao longo desses anos acadêmicos.

À minha avó, Alzira, por todo carinho, apoio e educação e aos meus tios, tia e primas pelo carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro, pela oportunidade de realizar este projeto, pela paciência, por todos os ensinamentos e pela parceria durante esses anos.

Às minhas amigas Anjaína e Josiane, por toda amizade, por todo apoio e carinho, e por terem sido minha família em Limeira. E ao Celsão, Paulão, à Aninha, Bia e Zaza pelo carinho, acolhimento e compartilhamento da Anja e da Josi.

Aos meus queridos amigos Monizzete, Fran, Lêlê, Bibis, Aline, Mari, Carina Azevedo, Simone e Daniel que fizeram parte do meu dia a dia no laboratório e que dividiram comigo toda sua experiência e amizade.

Às minhas amigas e parceironas Natália e Marina por toda a amizade, companheirismo, carinho, troca de experiências e apoio.

Ao Gabriel, pela amizade e ajuda com os trabalhos com *Parhyale hawaiiensis*, e à querida Gabi pela amizade e carinho.

Aos meus queridíssimos amigos Júlia, Thaís, Izabela, Jaqueline, Tainã, Carina, Andrey, Félix, Romeu e Tiago por todo apoio, carinho e amizade, que foram de enorme importância na minha vida nesse período.

Aos meus caros amigos Ana Catarino, Daiane, Diogo, Amelie, Napatr, Kelly e Márcia, por todo companheirismo e amizade durante minha estada em Edimburgo.

À minha querida psicóloga Taissa Stocco, por ser uma excelente profissional, por me ajudar no processo de autoconhecimento e a caminhar com mais tranquilidade nessa vida.

Ao prof. Dr. Theodore B. Henry, por toda disponibilidade e orientação durante o período de doutorado sanduíche na Heriot-Watt University.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes e à técnica Zezé, do Instituto de Oceanografia da USP, pelo conhecimento compartilhado e por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. José Roberto M. C. da Silva e ao Ms. Willian Reina Joviano, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo conhecimento compartilhado e ajuda na caracterização dos hemócitos.

Ao Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi, da Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP e Prof. Dra. Elisabeth Dyrinda, da Heriot-Watt University, pelos ensinamentos e colaboração.

Ao Thiago Pinheiro Rosa, por ser tão solícito e nos auxiliar em todas as burocracias referentes às agências de fomento à pesquisa.

À Prof. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, pela oportunidade de realização do Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em especial à Faculdade de Tecnologia e ao Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) pela oportunidade de realização deste estudo. E à Ádria e todos os alunos do LAEG.

Ao anfípode *Parhyale hawaiiensis*, por ter sido um presente para nós.

À Universidade de São Paulo (USP), em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade de realização deste doutorado e pelos ensinamentos compartilhados. À técnica administrativa do Serviço de Pós-Graduação e Pesquisa, Silvia Ines e às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Edna, Elaine e Samantha, por toda a paciência, profissionalismo e dedicação no atendimento aos alunos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) pela bolsa concedida de Doutorado Sanduíche no Exterior do Programa Ciência sem Fronteiras (Processo número: 208418/2017-2).

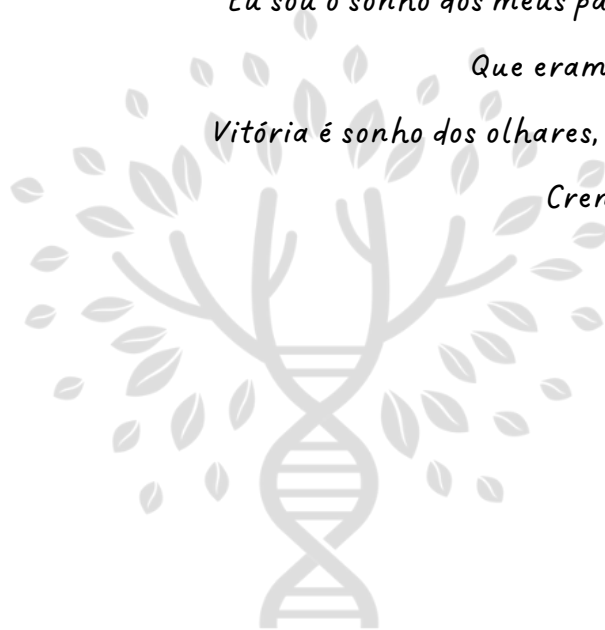
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento concedido aos projetos de pesquisa do LAEG (Processos número: 15/24758-5 e 20/04628-8).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todos, MUITO OBRIGADA!

*Eu sou o sonho dos meus pais, que eram sonhos dos avós  
Que eram sonhos dos meus ancestrais  
Vitória é sonho dos olhares, que nos aguardam nos lares  
Crendo que na volta somos mais.*

(Emicida; Nave, 2020)





## RESUMO

dos Santos, A. **Desenvolvimento de ensaios de toxicidade crônica utilizando o crustáceo marinho *Parhyale hawaiiensis***. 2022. 88f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Estabelecer testes de toxicidade que possam avaliar os efeitos dos contaminantes na sobrevivência, crescimento, reprodução, alterações comportamentais e fisiológicas dos organismos aquáticos são essenciais para derivar critérios de qualidade da água confiáveis e relevantes, especialmente para a proteção dos ecossistemas marinhos e estuarinos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver ensaios de toxicidade crônica utilizando uma espécie com distribuição circumtropical, o anfípode marinho epibêntico *Parhyale hawaiiensis*. Foi desenvolvido um protocolo de toxicidade crônica avaliando os *endpoints* de sobrevivência, reprodução e crescimento. Após testar diferentes desenhos experimentais, o melhor procedimento foi definido. Foi observado efeito concentração resposta para as duas substâncias de referência selecionadas (zinco e 3,4-dicloroanilina), indicando a viabilidade do método proposto. Foi realizada a descrição e identificação das células da hemolinfa de *P. hawaiiensis* para auxiliar no avanço do conhecimento sobre as funções imunológicas dos hemócitos para a futura utilização deste parâmetro em imunotoxicologia. Três tipos celulares foram identificados em *P. hawaiiensis*, granulócitos, semi-granulócitos e hialinócitos e sua proporção descrita. Lipídios foram detectados em todas as células, e foi observada a capacidade de fagocitose do hemócitos quando exposto a *E. coli*. Esses estudos ampliam ainda mais a possibilidade de utilização de *P. hawaiiensis* como um modelo em ecotoxicologia.

**Palavras-chave:** Anfípode. Sobrevivência. Reprodução. Crescimento. Hemócitos. Imunotoxicidade.

## ABSTRACT

dos Santos, A. **Development of chronic toxicity assays using the marine crustacean *Parhyale hawaiiensis***. 2022. 88f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Establishing toxicity tests that can assess the effects of contaminants on survival, growth, reproduction, behavioral and physiological changes of aquatic organisms are essential to derive reliable and relevant water quality criteria, especially for the protection of marine and estuarine ecosystems. The objective of this work was to develop chronic toxicity assays using a species with a circumtropical distribution, the marine epibenthic amphipod *Parhyale hawaiiensis*. A chronic toxicity protocol was developed to evaluate survival, reproduction, and growth endpoints. After testing different experimental designs, the best procedure was defined. A concentration-response effect was observed for the two selected reference substances (zinc and 3,4-dichloroaniline), indicating the feasibility of the proposed method. The description and identification of *P. hawaiiensis* hemolymph cells were carried out to help advance knowledge about the immunological functions of hemocytes for the future use of this parameter in immunotoxicology. Three cell types were identified in *P. hawaiiensis*, granulocytes, semi-granulocytes and hyalinocytes and their proportions were described. Lipids were detected in all cells, and the ability of hemocytes to phagocytose when exposed to *E. coli* was observed. These studies further expand the possibility of using *P. hawaiiensis* as a model in ecotoxicology.

**Keywords:** Amphipod. Survival. Reproduction. Growth. Hemocytes. Immunotoxicity.

## Lista de Ilustrações

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Casal de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . Macho carregando uma fêmea em posição de acasalamento conhecida como amplexo. A seta branca indica os gnatópodos maiores do macho. ....  | 18 |
| <b>Figura 2.</b> Embriogênese de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . Embriões nos estágios <sup>(a)</sup> indicados em horas (h) ou dias (d) após a postura dos ovos. Todos os estágios embrionários estão em escala (Fonte: RALLIS; KAPAI; PAVLOPOULOS, 2021). .... | 19 |
| <b>Figura 3.</b> Carta-controle de <i>Parhyale hawaiiensis</i> utilizando zinco (Zn) como substância de referência. ....   | 20 |

### CAPÍTULO 1

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos para cada uma das condições de exposição testados com <i>Parhyale hawaiiensis</i> . As condições aceitas do meio para <i>P. hawaiiensis</i> foram: oxigênio dissolvido $6 \pm 2$ mg L <sup>-1</sup> (caixa cinza claro), pH $8 \pm 1$ (linhas tracejadas) e salinidade $30 \pm 2$ (linhas pontilhadas), de acordo com Artal et al. (2018). .... | 32 |
| <b>Figura 2.</b> Efeitos do zinco na sobrevivência (A), reprodução (B) e crescimento (C, fêmea e D, macho) de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . Cada ponto representa a média (com desvio padrão) das cinco réplicas de cada concentração, incluindo o controle. ....   | 38 |
| <b>Figura 3.</b> Efeitos da 3,4-dicloroanilina na sobrevivência (A), reprodução (B) e crescimento (C, fêmea e D, macho) de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . Cada ponto representa a média (com desvio padrão) das cinco réplicas de cada concentração, incluindo controle. ....  | 39 |
| <b>Figura 4.</b> Parâmetros físico-químicos dos testes de toxicidade crônica com zinco (testes 1 (A) e 2 (B)) e 3,4-dicloroanilina (testes 1 (C) e 2 (D)) com <i>Parhyale hawaiiensis</i> <sup>(a)</sup> . ....   | 40 |

### CAPÍTULO 2

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Coleta de hemolinfa de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . ....  | 51 |
| <b>Figura 2.</b> Porcentagem dos tipos de hemócitos observados em <i>Parhyale hawaiiensis</i> para cada sexo. ....  | 57 |
| <b>Figura 3.</b> Gráficos obtidos da análise em citômetro de fluxo (contagem, tamanho e granulosidade) <sup>(a)</sup> das células da hemolinfa de <i>Parhyale hawaiiensis</i> <sup>(b)</sup> . .... | 58 |
| <b>Figura 4.</b> Hemócitos de <i>Parhyale hawaiiensis</i> corados com Sudan Black B. ....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 5.</b> Hemócitos espalhados de <i>Parhyale hawaiiensis</i> observados ao microscópio. (A-C). <i>Escherichia coli</i> (pontos laranja escuros) fagocitadas pelas células. (D-F). Hemócitos espalhados corados com Rosenfeld..... | 61 |
|---|----|

### CAPÍTULO 3

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Adultos de <i>Echinogammarus marinus</i> .....  | 69 |
| <b>Figura 2.</b> Local de amostragem, Estação Marinha de St Abbs na Vila St Abbs, na costa sudeste da Escócia (Fonte: Google Maps). .....  | 73 |
| <b>Figura 3.</b> Amostragem de água do mar e microplásticos na Estação Marinha de St Abbs. ....  | 74 |
| <b>Figura 4.</b> Consumo de oxigênio de <i>Echinogammarus marinus</i> expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias.....  | 78 |
| <b>Figura 5.</b> Contagem celular total da hemolinfa de <i>Echinogammarus marinus</i> expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias. ....                       | 79 |
| <b>Figura 6.</b> Porcentagem dos diferente tipos de hemócitos da hemolinfa de <i>Echinogammarus marinus</i> expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias. .... | 80 |
| <b>Figura 7.</b> Número de fibras encontradas em cada campanha, após diferentes tempos de digestão das amostras.....   | 81 |
| <b>Figura 8.</b> Comprimento das fibras (mm) dos controles e de cada amostra, das duas campanhas e nos diferentes tempos de digestão. ....   | 81 |
| <b>Figura 9.</b> Fluorescência das fibras padrão em diferentes luzes (vermelho e verde), antes e depois do processo de digestão.....   | 84 |

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO 1

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Diferentes condições de exposição testadas para determinar os parâmetros para o teste de toxicidade crônica com <i>Parhyale hawaiiensis</i> . .....   | 27 |
| <b>Tabela 2.</b> Sobrevivência (%) de <i>Parhyale hawaiiensis</i> ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída. ....   | 32 |
| <b>Tabela 3.</b> Número de fêmeas e reprodução (expresso em neonatos/fêmea e neonatos/organismo vivo) de <i>Parhyale hawaiiensis</i> , ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída. ....                    | 34 |
| <b>Tabela 4.</b> Taxa média de crescimento (mm/organismo/dia) de <i>Parhyale hawaiiensis</i> ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída. ....  | 35 |
| <b>Tabela 5.</b> Comparação dos métodos de testes de toxicidade crônica com anfípodes marinhos. ....   | 37 |
| <b>Tabela 6.</b> Comparação dos valores de concentração de efeito não observado (CENO) para zinco e 3,4-dicloroanilina obtidos nos testes de toxicidade crônica com <i>Parhyale hawaiiensis</i> realizados neste trabalho e outros anfípodes de água doce e do mar. .... | 41 |

### CAPÍTULO 2

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Técnicas de coloração testadas para identificar os hemócitos do anfípode marinho <i>Parhyale hawaiiensis</i> . ....            | 55 |
| <b>Tabela 2.</b> Métodos de preparação de lâminas testados para identificar os hemócitos do anfípode marinho <i>Parhyale hawaiiensis</i> . .... | 56 |
| <b>Tabela 3.</b> Resumo da descrição e das principais características dos hemócitos de <i>Parhyale hawaiiensis</i> . ....                       | 56 |

### CAPÍTULO 3

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Parâmetros avaliados para identificar os hemócitos do anfípode marinho <i>Echinogammarus marinus</i> . .... | 77 |
| <b>Tabela 2.</b> Taxa de recuperação do processo de digestão das fibras padrão. ....   | 82 |

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2. OBJETIVO.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>3. CULTURA E CONTROLE DA SENSIBILIDADE DE <i>PARHYALE HAWAIENSIS</i> .....</b> | <b>18</b> |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 21        |
| <b>4. CAPÍTULO 1.....</b>   | <b>24</b> |
| 4.1. INTRODUÇÃO .....   | 25        |
| 4.2. METODOLOGIA .....  | 27        |
| 4.4. CONCLUSÕES .....   | 43        |
| 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 44        |
| <b>5. CAPÍTULO 2.....</b>   | <b>48</b> |
| 5.1. INTRODUÇÃO .....   | 49        |
| 5.2. METODOLOGIA .....  | 51        |
| 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 54        |
| 5.4. CONCLUSÃO.....   | 62        |
| 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 63        |
| <b>6. CAPÍTULO 3.....</b>   | <b>66</b> |
| 6.1. INTRODUÇÃO .....   | 67        |
| 6.2. METODOLOGIA .....  | 69        |
| 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 76        |
| 6.4. CONCLUSÕES .....   | 85        |
| 6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 86        |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>88</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental marinha é um problema reconhecido em todo o mundo, principalmente devido ao lançamento de esgotos, resíduos industriais, resíduos químicos e materiais radioativos provenientes de atividades humanas (KUMAR; PRASANAMEDHA, 2021). Mostofa et al. (2013) listaram os principais problemas em ecossistemas marinhos, que são: descarga de contaminantes emergentes; aumento de toxinas durante a proliferação de algas devido aos efeitos da poluição da matéria orgânica e do aquecimento global; acidificação das águas superficiais marinhas; indústrias de desmantelamento e reciclagem de navios, juntamente com a exploração e transporte de petróleo, podem ter efeitos catastróficos na biodiversidade devido à matéria orgânica, metais e outros poluentes; e sobrepesca que esgota os ecossistemas e levou a um declínio global nas capturas de peixes.

A derivação de critérios de qualidade de água e sedimentos visa proteger as diferentes formas de vida aquática dos ecossistemas dos efeitos adversos causados por substâncias químicas. Porém, para que seja possível derivar um critério, um conjunto mínimo de dados ecotoxicológicos são necessários, como, por exemplo, ensaios com organismos de diferentes níveis tróficos e ensaios que observem efeitos crônicos (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Os anfípodes tem sido o grupo de organismos mais utilizado para a avaliação da qualidade de marinhos e estuarinos, devido ao seu habitat e estilo de vida (CASTRO et al., 2006; CHAPMAN et al., 1992; MANYIN; ROWE, 2006). Esses organismos vivem na interface sedimento-água, ou enterrados no sedimento, o que os faz estar em exposição contínua aos contaminantes presentes na água e nos sedimentos.

O anfípode marinho *Parhyale hawaiensis* distribuição circumtropical e vive em áreas marinhas e estuarinas nas regiões entre marés (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986; SHOEMAKER, 1956). No Brasil, foi reportada nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e São Paulo (ALVES; PEREIRA; BARRETO, 2009; AMARAL; NALLIN, 2011; OLIVEIRA, 2004). É considerado um modelo promissor para o desenvolvimento de testes de toxicidade, e devido a sua característica epibêntica pode ser utilizado em ensaios com matrizes aquosas ou sólidas, como sedimentos e lodos (VACCHI et al., 2019). Há substancial informação biológica disponível sobre a espécie, referentes a seus sistemas nervoso, respiratório e vascular (DIVAKARAN, 1982; DIVAKARAN; PILLAI, 1981, 1975). Além disso, desde o início dos anos 2000 este organismo tem emergido como um modelo atraente para estudos sobre desenvolvimento, genética e biologia evolutiva (ALWES; HINCHEN; EXTAVOUR, 2011; BROWNE et al., 2005; EXTAVOUR, 2005; GERBERDING; BROWNE;

PATEL, 2002; PRICE et al., 2010; REHM et al., 2009). Foram realizados avanços consideráveis na compreensão da biologia de *P. hawaiiensis* e recentemente, seu genoma foi sequenciado (BLYTHE et al., 2012; KAO et al., 2016). *P. hawaiiensis* é um organismo detritívoro, de fácil crescimento em laboratório, podendo ser cultivado em culturas densas. É capaz de tolerar variações em alguns parâmetros da água, como salinidade e temperatura, e tem um ciclo de vida relativamente rápido (tempo de geração de 2 meses) (BROWNE et al., 2005).

No campo da ecotoxicologia, o grupo de pesquisa do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, iniciou o uso de *P. hawaiiensis* como organismo-teste. Um protocolo de cultivo de *P. hawaiiensis* em laboratório foi desenvolvido com sucesso. Testes de toxicidade aguda miniaturizados foram desenvolvidos e aplicados para metais, substâncias orgânicas e amostras de água e sedimento (ARTAL et al., 2018, 2019; VACCHI et al., 2019; WILLIAMS et al., 2022a, 2022b). Métodos para determinação da dose interna de metais e compostos orgânicos, utilizando a hemolinfa do organismo, foram estudados e aplicados em estudos de toxicocinética (DOS SANTOS et al., 2022a; VANNUCI-SILVA et al., 2018, 2019). Estudos de expressão gênica em organismos expostos a nanomateriais e íons metálicos indicaram diferença de resposta tanto em relação ao sexo, quanto em relação aos dois tipos de tratamento (ARTAL et al., 2020). Um método para estudar efeitos na regeneração de antenas de *P. hawaiiensis* foi desenvolvido e utilizado para avaliar um inibidor de crescimento, utilizado na agricultura (DIEHL et al., 2021). Protocolos para verificar danos no DNA e alterações cromossômicas também foram otimizados e aplicados utilizando a hemolinfa de *P. hawaiiensis* (BOTELHO et al., 2022). Recentemente, um artigo de revisão intitulado “*The amphipod Parhyale hawaiiensis as a promising model in ecotoxicology*” foi publicado pelo grupo do LAEG (DOS SANTOS et al., 2022b) na Revista *Chemosphere*, resumindo o uso de *P. hawaiiensis* em ecotoxicologia. Fica evidente que *P. hawaiiensis* é um organismo-teste promissor em ecotoxicologia, e o desenvolvimento de novos protocolos é importante para torná-lo um modelo robusto que possa ser utilizado para o estabelecimento de critérios relevantes e confiáveis de qualidade de águas marinhas tropicais.



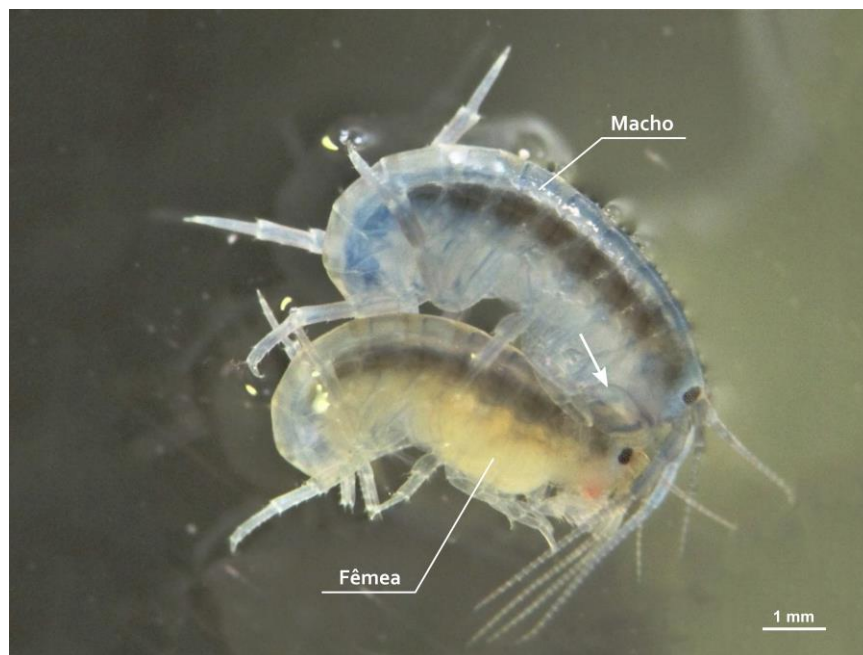
## 2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo, foi o desenvolvimento de novas abordagens para utilizar *Parhyale hawaiiensis* em testes crônicos que avaliam sobrevivência, reprodução e crescimento, e subsidiar informações para testes de imunotoxicidade. O trabalho foi dividido em três capítulos. No capítulo 1, foram descritos os procedimentos realizados para o desenvolvimento de um teste crônico para avaliar os efeitos na sobrevivência, reprodução e crescimento de *P. hawaiiensis* e os principais resultados obtidos. No capítulo 2, foram apresentados os métodos investigados para a caracterização dos hemócitos da hemolinfa de *P. hawaiiensis*, e as principais características descobertas dessas células, para fornecer dados para futuros estudos de imunotoxicidade. No capítulo 3, foram descritas as técnicas aprendidas pela aluna em seu doutorado sanduíche que viabilizaram a caracterização dos hemócitos apresentada no Capítulo 2. Também, foram apresentados os métodos e resultados das análises de microplásticos em água do mar, realizadas durante o estágio.

### 3. CULTURA E CONTROLE DA SENSIBILIDADE DE *PARHYALE HAWAIENSIS*

*Parhyale hawaiiensis* é uma espécie que apresenta dimorfismo sexual, assim os machos adultos podem ser facilmente diferenciados das fêmeas. Para isso é preciso observar o segundo par de gnatópodes, que são maiores nos machos (Figura 1). Um macho sexualmente maduro usa o outro primeiro par de gnatópodes menores para agarrar e carregar uma fêmea, protegendo-a contra outros machos antes da cópula, este comportamento é conhecido como amplexo e pode variar de horas à dias (CONLAN, 1991). Pouco antes da cópula, a fêmea passa pelo processo de muda, e produz uma nova câmara de incubação (marsúpio). Neste momento, o macho deposita o esperma no marsúpio, e a fêmea ovula, depositando seus ovócitos no marsúpio enquanto o novo exoesqueleto ainda é flexível para permitir sua passagem pelos ovidutos (HYNE, 2011), e então ocorre a fertilização.

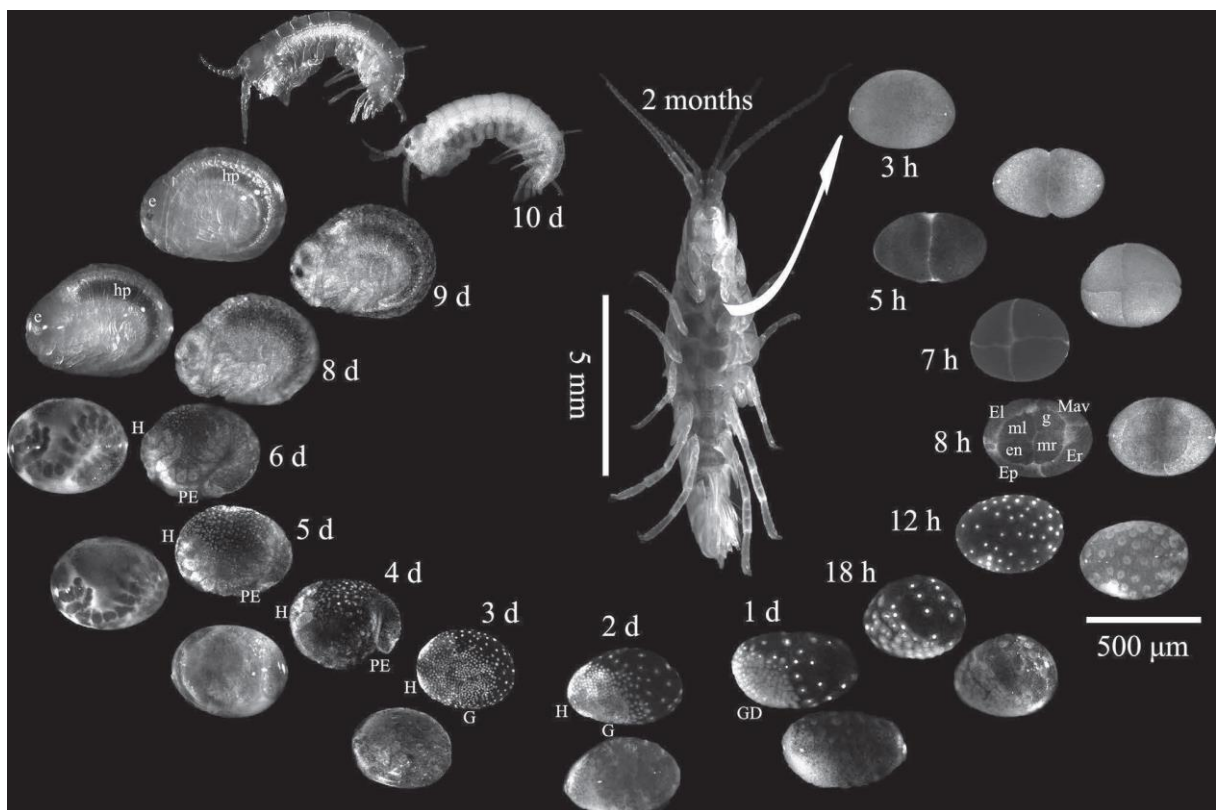
**Figura 1.** Casal de *Parhyale hawaiiensis*. Macho carregando uma fêmea em posição de acasalamento conhecida como amplexo. A seta branca indica os gnatópodos maiores do macho.



Cada fêmea de *P. hawaiiensis* colocam cerca de 5 a 30 ovos durante cada ciclo de muda, dependendo de sua idade e tamanho, e podem produzir ninhadas sucessivas a cada poucas semanas durante sua vida. Após a fertilização, os embriões de cada ninhada se desenvolvem de forma bastante síncrona dentro do marsúpio (RALLIS; KAPAI; PAVLOPOULOS, 2021). O tempo de embriogênese, que é o tempo de desenvolvimento do embrião desde a fertilização até a eclosão, leva de 10 a 14 dias à 26°C (BROWNE et al., 2005; EXTAVOUR, 2005). O

desenvolvimento de *P. hawaiiensis* é direto, os neonatos nascem com intestino e conjunto de apêndices completos e são semelhantes aos adultos (EXTAVOUR, 2005). Os neonatos crescem através de sucessivas mudas e atingem a maturidade sexual cerca de seis a sete semanas após a eclosão (EXTAVOUR, 2005). Na figura 2, um esquema da embriogênese de *P. hawaiiensis* pode ser observado.

**Figura 2.** Embriogênese de *Parhyale hawaiiensis*. Embriões nos estágios<sup>(a)</sup> indicados em horas (h) ou dias (d) após a postura dos ovos. Todos os estágios embrionários estão em escala (Fonte: RALLIS; KAPAI; PAVLOPOULOS, 2021).



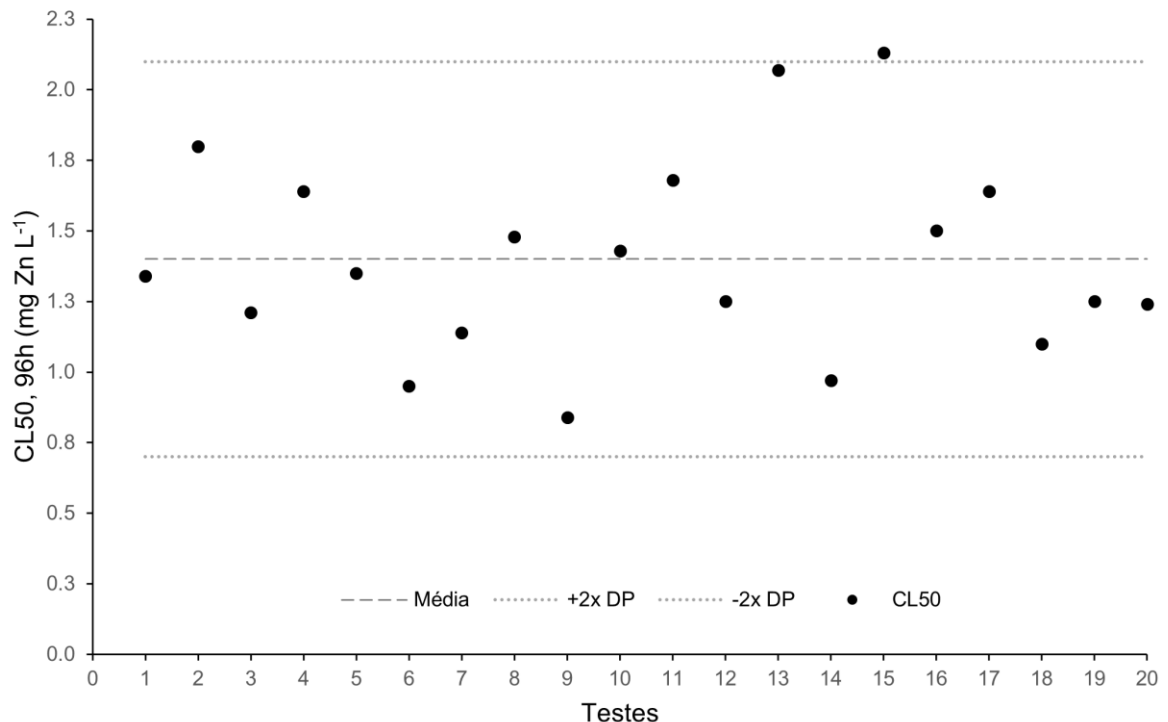
<sup>(a)</sup>Siglas dos estágios: GD, disco germinativo; H, cabeça; G, organização celular em forma de grade; PE, extremidade posterior; hp, ceco hepatopancreático; e, olho (Fonte: RALLIS; KAPAI; PAVLOPOULOS, 2021).

Os organismos utilizados nos estudos apresentados nos capítulos 1 e 2, foram provenientes do cultivo mantido no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas em Limeira. Para início do cultivo, em meados de 2010, os organismos foram coletados no costão rochoso Poço de Anchieta, na cidade de Itanhaém (24°12'6,42"S, 46°48'38,47"W), no estado de São Paulo, região sudeste do Brasil (Artal et al., 2018). Posteriormente, os anfípodes foram identificados como *P. hawaiiensis*, com base na morfologia do organismo, por especialistas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

*P. hawaiiensis* é cultivada em recipientes plásticos de 5,0L com cerca de 2,5L de água do mar reconstituída em salinidade 30 (Red Sea Salt), contendo coral triturado (granulometria 8, Nature's Ocean) como substrato e aeração constante, dentro de câmaras incubadoras (Marconi) com temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo (12h luz e 12h escuro) controlados. A alimentação é realizada diariamente com ração para peixe herbívoro em pastilha (JBL), de acordo com Artal et al. (2018).

Testes de sensibilidade (ensaios agudos, 96h) foram realizados periodicamente para verificar a aceitabilidade da cultura (USEPA, 2001). Na figura 3, pode ser observado a carta-controle dos ensaios com a substância de referência selecionada, o zinco. A média das concentrações letais de 50% (CL50) foi calculada a partir de 20 ensaios realizados, utilizando diferentes lotes de organismos. Os valores de CL50 ficaram dentro dos limites superior e inferior ( $\pm 2x$  desvio padrão) e o coeficiente de variação foi de 25%, estando de acordo com o estabelecido pelas normas ( $\text{CV} \leq 30\%$ ) (ABNT, 2021).

**Figura 3.** Carta-controle de *Parhyale hawaiiensis* utilizando zinco (Zn) como substância de referência.



DP, desvio padrão; CL50, concentração letal de 50%

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR15638:2021 Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos**. Rio de Janeiro, Brasil, 2021.
- ALVES, S. S.; PEREIRA, V. F. G. C.; BARRETO, F. B. Flutuação de *Parhyale hawaiiensis* (Crustacea, Amphipoda, Hyalidae) da macrofauna de fital dos costões rochosos da praia da Ilha Comprida, Tarituba, RJ. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**. São Lourenço, MG, Brasil: 2009
- ALWES, F.; HINCHEN, B.; EXTAVOUR, C. G. Patterns of cell lineage, movement, and migration from germ layer specification to gastrulation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **Developmental Biology**, v. 359, n. 1, p. 110–123, nov. 2011.
- AMARAL, A. C. Z.; NALLIN, S. A. H. **Biodiversidade e ecossistemas bentônicos marinhos do Litoral Norte de São Paulo, Sudeste do Brasil**. Campinas, SP: Unicamp/IB, 2011.
- ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 15 mar. 2018.
- ARTAL, M. C. et al. Toxicity responses for marine invertebrate species of brazilian occurrence. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 14, n. 1, p. 15–25, 27 ago. 2019.
- ARTAL, M. C. et al. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113963, maio 2020.
- BLYTHE, M. J. et al. High Through-Put Sequencing of the *Parhyale hawaiiensis* mRNAs and microRNAs to Aid Comparative Developmental Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33784, 20 mar. 2012.
- BOTELHO, M. T. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 881, n. July, p. 503527, set. 2022.
- BROWNE, W. E. et al. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. **Genesis**, v. 42, n. 3, p. 124–149, 2005.
- CASTRO, H. et al. Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: An example from Ria de Aveiro, NW Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 1–4, p. 91–99, jan. 2006.
- CHAPMAN, P. et al. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, n. 1–3, p. 253–264, 1992.
- CONLAN, K. E. Precopulatory mating behavior and sexual dimorphism in the amphipod Crustacea. **Hydrobiologia**, v. 223, n. 1, p. 255–282, out. 1991.
- DIEHL, O. J. et al. Antenna regeneration as an ecotoxicological endpoint in a marine amphipod: a proof of concept using dimethyl sulfoxide and diflubenzuron. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 751–755, 26 maio 2021.
- DIVAKARAN, O. Nervous system of *Parhyale hawaiiensis* Dana (Crustacea: Amphipoda). **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. B48, n. 2, p. 218–224, 1982.
- DIVAKARAN, O.; PILLAI, K. Functional morphology of the respiratory system of *Parhyale hawaiiensis* Dana (Crustacea: Amphipoda). **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 47, n. 5B, p. 664–669, 1981.

- DIVAKARAN, O.; PILLAI, N. K. The Vascular System of *Parhyale hawaiiensis* (Amphipoda). **Acta Zoologica**, v. 56, n. 2, p. 129–139, jun. 1975.
- DOS SANTOS, A. et al. Measuring concentrations of a dye in the hemolymph of a marine amphipod: Development of a protocol for exposure assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, n. October 2021, p. 113376, fev. 2022a.
- DOS SANTOS, A. et al. The amphipod *Parhyale hawaiiensis* as a promising model in ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 307, n. August, p. 135959, nov. 2022b.
- EMICIDA - OLIVEIRA, L. R; NAVE - MOREIRA, V. L. Trevo, Figuiinha e Suor na Camisa. In: EMICIDA; SANGALO, I. **Single: Trevo, Figuiinha e Suor na Camisa**. Laboratório Fantasma, 2020. Disponível em: <https://open.spotify.com/track/5XlSsxpTi0usJnQSUwBORk?si=46ee0b0e27894ce6>
- EUROPEAN COMMISSION. **Common Implementation Strategy for the WFD, Guidance Document No . 27, Technical Guidance For Deriving Environmental Quality Standards**. [s.l: s.n.].
- EXTAVOUR, C. G. The fate of isolated blastomeres with respect to germ cell formation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **Developmental Biology**, v. 277, n. 2, p. 387–402, 2005.
- GERBERDING, M.; BROWNE, W. E.; PATEL, N. H. Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals an early restriction of cell fates. **Development**, v. 129, n. 24, p. 5789–5801, 15 dez. 2002.
- HYNE, R. V. Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2647–2657, dez. 2011.
- KAO, D. et al. The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. **eLife**, v. 5, n. November 2016, p. 1–45, 16 nov. 2016.
- KUMAR, P. S.; PRASANNAMEDHA, G. Biological and chemical impacts on marine biology. In: **Modern Treatment Strategies for Marine Pollution**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 11–27.
- MANYIN, T.; ROWE, C. L. Chronic exposure of *Leptocheirus plumulosus* to Baltimore Harbor sediment: Bioenergetic and population-level effects. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. 2, p. 116–130, ago. 2006.
- MOSTOFA, K. M. G. et al. Sources, factors, mechanisms and possible solutions to pollutants in marine ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 461–478, nov. 2013.
- OLIVEIRA, D. A. **Distribuição Espacial e Temporal dos Anfípodos Gammarídeos Associados a Diferentes Substratos Secundários do Costão Rochoso de praias do Litoral Norte do Estado de São Paulo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- POOVACHIRANON, S.; BOTO, K.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 98, n. 1–2, p. 129–140, jan. 1986.
- PRICE, A. L. et al. Mesoderm and ectoderm lineages in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* display intra-germ layer compensation. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 256–266, 2010.
- RALLIS, J.; KAPAI, G.; PAVLOPOULOS, A. *Parhyale hawaiiensis*, Crustacea. In: **Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2021. p. 289–306.
- REHM, E. J. et al. The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: A new model for arthropod development. **Cold**

- Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 1, 2009.
- SHOEMAKER, C. R. Observations on the Amphipod Genus *Parhyale*. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 106, n. 3372, p. 345–358, 1956.
- USEPA. **600/R-01/020: Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-associated Contaminants with the Amphipod *Leptocheirus Plumulosus*, First Edition**. U.S. Environmental Protection Agency, 2001.
- VACCHI, F. I. et al. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, n. April, p. 110658, dez. 2019.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. Higher silver bioavailability after nanoparticle dietary exposure in marine amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 806–810, 19 abr. 2019.
- WILLIAMS, T. N. et al. Metal-complexed monoazo dyes as sustainable permanent hair dye alternatives—Toxicological and durability properties. **Dyes and Pigments**, Perspectives in Pragmatics, Philosophy & Psychology. v. 197, n. september, p. 109819, jan. 2022a.
- WILLIAMS, T. N. et al. Evaluation of the Toxicological and Color Properties of Anionic Hydrophobic Monoazo Dyes for Sustainable Human Hair Coloration. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 8, p. 2593–2601, 28 fev. 2022b.

# Capítulo 1



*Neste capítulo foram apresentados os dados obtidos na etapa de desenvolvimento do teste crônico com *Parhyale hawaiiensis*, que avalia os endpoints de sobrevivência, reprodução e crescimento, e os resultados com as substâncias de referência, utilizadas para verificar a viabilidade do ensaio.*



#### 4.1. INTRODUÇÃO

Para a proteção da vida aquática marinha, a avaliação do risco ecológico é uma ferramenta muito importante, que inclui as caracterizações de exposição e perigo (USEPA, 1998). Para caracterização de perigos são necessários testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade crônica são ecologicamente mais relevantes para a avaliação de risco ecológico, pois representam cenários de exposição ambientalmente mais realistas (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019; VAN DEN HEUVEL-GREVE et al., 2007). Geralmente, os testes de toxicidade crônica exigem mais esforço e tempo do que os testes agudos, mas os *endpoints* subletais, como reprodução e crescimento, têm maior potencial para mostrar uma resposta tóxica de substâncias químicas e/ou amostras ambientais, que não causam efeitos agudos, como por exemplo, uma mortalidade significativa (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019; USEPA, 2001).

A seleção de organismos-teste para a realização de testes de toxicidade crônica é um tópico crítico, pois eles precisam cobrir parte do ciclo de vida dos organismos (MANYIN; ROWE, 2006). Os organismos-teste devem ter um ciclo de vida relativamente curto, para que os efeitos adversos no crescimento e na reprodução possam ser observados dentro de um período de teste razoável (COSTA et al., 2005). Os crustáceos anfípodes estão entre os táxons de invertebrados mais utilizados em testes de toxicidade marinha e estuarina. São ecologicamente relevantes, pois fazem elos importantes nas cadeias alimentares costeiras e amplamente distribuídos, permitindo comparações entre diferentes regiões, e passíveis de cultivo em laboratório (DEWITT et al., 1992; MELO; NIPPER, 2007; NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002; RUPPERT; BARNES, 1996). Além disso, os anfípodes em geral vivem na interface sedimento-água, ou enterrados no sedimento, o que significa que estão continuamente expostos a produtos químicos presentes na água e no sedimento. Eles também são conhecidos por serem sensíveis a uma ampla gama de contaminantes (KING et al., 2006). Geralmente, os testes de toxicidade aguda com anfípodes duram 96 horas e avaliam a mortalidade como *endpoint*. Já nos testes de toxicidade crônica, o tempo de exposição varia de acordo com cada espécie, e os *endpoints* avaliados são sobrevivência, reprodução e crescimento (ASTM, 2014; USEPA, 2001).

Os ensaios com anfípodes têm sido ferramentas importantes para avaliar a qualidade de ambientes marinhos e estuarinos em todo o mundo. Por exemplo, na América do Norte, as espécies recomendadas por órgãos ambientais e grupos de pesquisa são *Leptocheirus plumulosus*, *Ampelisca abdita*, *Corophium volutator*, *Rhepoxinius abronius*, *Eohaustorius washingtonianus*, *Eohaustorius estuarius*, *Amphiporeia virginiana*, *Foxiphalus xiximeus*,

*Leptocheirus pinguis* (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019). Na Europa, as mais utilizadas são *C. volutator*, *C. multisetosum*, *C. orientale* e *M. insidiosum* (PODLESÍNSKA; DAŁBROWSKA, 2019). Todas as espécies acima são de clima temperado. Na América do Sul, especialmente em regiões tropicais, a maioria dos testes com anfípodes tem sido realizada com organismos-teste nativos/locais, como por exemplo a *Tiburonella viscana*, recomendada na ABNT NBR15638:2021 (ABNT, 2021), no entanto são realizados testes com espécies de referência, geralmente de áreas temperadas para comparação da toxicidade (NASCIMENTO, 2007). Testes de toxicidade com organismos representativos de compartimentos marinhos e estuarinos são essenciais para derivar critérios de qualidade da água confiáveis e relevantes e avaliar a qualidade de ambientes tropicais.

*Parhyale hawaiiensis* é um anfípode marinho epibêntico com distribuição circumtropical mundial. Habita baías, manguezais e estuários, associados a costões rochosos, algas ou outros organismos, em grandes populações (POOVACHIRANON; BOTO; DUKE, 1986; SHOEMAKER, 1956; TARARAM; WAKABARA; LEITE, 1978). *P. hawaiiensis* é um anfípode que se alimenta de detritos, tendo assim um papel importante na cadeia alimentar (BROWNE et al., 2005). Tem sido considerado um organismo ideal para estudos comparativos de desenvolvimento evolutivo, bem como regeneração, aspectos da biologia sensorial, cronobiologia, bioprocessamento e ecotoxicologia (PARIS et al., 2022). Com base neste cenário, *Parhyale hawaiiensis* poderia ser um bom candidato para o desenvolvimento de um teste de toxicidade crônica. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo, para testar substâncias/compostos em água, e avaliar a sobrevivência, reprodução e crescimento utilizando esse organismo e aplicá-lo utilizando substâncias de referência.

## 4.2. METODOLOGIA

### 4.2.1. Condições de exposição avaliados para teste de toxicidade crônica

Diferentes condições de exposição foram testadas para selecionar a melhor condição para o teste de toxicidade crônica com o anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis*, para permitir a avaliação das respostas quanto à sobrevivência, reprodução e crescimento. Os parâmetros para o desenho experimental como número de réplicas, número de organismos por réplica, renovação de água foram selecionados com base nas normas USEPA 600/R-01/020 (USEPA, 2001) e ASTM E1367-03 (ASTM, 2014), que definem métodos para testes de toxicidade crônica com sedimento utilizando uma espécie de anfípode marinho. O volume de solução, quantidade de alimento e dieta foram baseados utilizando as informações descritas em Artal et al. (2018). Os parâmetros de idade inicial dos organismos e tempo de duração do teste foram baseados em algumas informações sobre o ciclo de vida de *P. hawaiiensis* já descritas na literatura (BROWNE et al., 2005). Na tabela 1 pode ser observado as diferentes condições testadas e os parâmetros avaliados. Todos os experimentos foram realizados com areação constante e coral triturado (granulometria 8, Nature's Ocean) como substrato em cada réplica, e mantidos dentro de câmara incubadora (Marconi) com temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e fotoperíodo (12h luz e 12h escuro) controlados.

**Tabela 1.** Diferentes condições de exposição testadas para determinar os parâmetros para o teste de toxicidade crônica com *Parhyale hawaiiensis*.

| Parâmetros                 | Condição 1     | Condição 2              | Condição 3     | Condição 4     |
|----------------------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|
| Volume do meio por réplica | 100 mL         | 200 mL                  | 100 mL         | 100 mL         |
| Réplicas por tratamento    | 5              | 5                       | 5              | 5              |
| Organismos por réplica     | 10             | 20                      | 10             | 10             |
| Dieta                      | 0,003 g        | 0,006 g                 | 0,003 g        | 0,003 g        |
| Alimentação                |                | 3 vezes na semana       |                |                |
| Renovação do meio          |                | 50% - 3 vezes na semana |                |                |
| Tempo de exposição         | 92 dias        | 92 dias                 | 60 dias        | 40 dias        |
| Idade dos organismos       | $\leq 14$ dias | $\leq 14$ dias          | $\leq 46$ dias | $\leq 52$ dias |

Os parâmetros físico-químicos foram acompanhados nos dias de troca parcial da água durante todos os experimentos. Artal et al. (2018) estabeleceram valores aceitáveis de pH, oxigênio dissolvido e salinidade para as culturas de *P. hawaiiensis*, os quais foram adotados no presente estudo. Durante os experimentos foram contabilizados o número de neonatos nascidos, e ao final, o número de organismos sobreviventes e para medição dos organismos, fotos foram capturadas utilizando um estereomicroscópio (Stemi 2000-C, Carl Zeiss) com camera acoplada (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss) e o software Zen 2.3 Lite (Carl Zeiss). Os organismos foram medidos utilizando o software ImageJ (versão 1.52n, SCHINDELIN et al., 2012).

#### 4.2.2. Protocolo de teste de toxicidade crônica proposto

Para verificar a viabilidade do protocolo de teste de toxicidade crônica desenvolvido com *P. hawaiiensis*, foram realizados testes com substâncias de referência. O zinco foi selecionado, pois segundo Gale et al. (2006), causou efeitos na reprodução e crescimento do anfípode estuarino *Melita plumulosa*. As concentrações de zinco foram definidas com base em testes agudos com neonatos, que foram realizados previamente no LAEG. A solução-estoque de sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , CAS 7446-20-0, >99% de pureza, Sigma-Aldrich) foi preparada em água deionizada, e as soluções-teste (0,02 a 2,0 mg Zn L<sup>-1</sup>) foram preparadas em água do mar reconstituída (salinidade 30), não excedendo o volume de solução-estoque em 10%. A solução-estoque foi preparada semanalmente e utilizada nas três trocas semanais do meio. Análises químicas foram realizadas nas soluções-estoque de zinco, no dia do preparo e no último dia de uso (ver item 4.2.3). Dois testes independentes foram realizados com zinco.

Uma substância orgânica também foi testada, a 3,4-dicloroanilina ( $Cl_2C_6H_3NH_2$ , CAS 95-76-1, 98% de pureza, Sigma-Aldrich). A 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) é um desregulador endócrino e conhecidamente muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos adversos a longo prazo no ambiente aquático (ECHA, 2006). Além disso, a 3,4-DCA foi selecionada, pois segundo Taylor et al. (1994), afetou significativamente o crescimento de neonatos do anfípode de água doce *Gammarus pulex*, e segundo Adema e Vink (1981), esta substância causou efeitos na reprodução do anfípode intertidal *Echinogammarus marinus*. Anteriormente, foi realizado um teste de toxicidade aguda, com organismos com  $\leq 52$  dias de idade, para estabelecer as concentrações subletais a serem utilizadas no teste crônico (dados não apresentados). As soluções-estoque de 3,4-DCA foram preparadas em água do mar reconstituída (salinidade 30) e colocadas em ultrassom (UltraCleaner 1400, Unique) por 10 min. A cada renovação do meio, realizada 3 vezes na semana, uma nova solução-estoque foi preparada e uma alíquota foi utilizada para analisar quimicamente a concentração da solução

(ver item 4.2.3). As soluções-teste (0,01 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>) também foram diluídas em água do mar reconstituída (salinidade 30). Dois testes independentes foram realizados com 3,4-DCA.

Durante as renovações dos meios, os neonatos foram contados e removidos, e os parâmetros físico-químicos dos meios removidos foram analisados (pH, salinidade e oxigênio dissolvido). Ao final dos testes, os organismos vivos foram contados e preservados em etanol 70% para posterior captura de fotos. As fotos foram capturadas usando um estereomicroscópio (Stemi 2000-C, Carl Zeiss) com câmera acoplada (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss), e o software ImageJ (versão 1.52n, SCHINDELIN et al., 2012) foi utilizado para medir o comprimento do organismo (base do rosto à base do tálson). Os testes foram considerados válidos quando a sobrevivência média do controle foi  $\geq 80\%$ . A sobrevivência foi reportada como a porcentagem de organismos vivos ao final do teste, a reprodução foi expressa pelo número de neonatos por fêmea viva no final do teste e a taxa de crescimento foi expressa pela média por réplica do comprimento por dia por adulto sobrevivente no final do teste.

#### 4.2.3. Análise química das soluções-estoque

As soluções-estoque de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, CAS 7446-20-0, > 99% de pureza, Sigma-Aldrich) foram preparadas em água deionizada. Uma alíquota de cada solução foi acidificada (pH  $\leq 2$ ) com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>, CAS 7697-37-2, p.a., 65% de pureza, Sigma-Aldrich) para preservação do metal. A análise de zinco foi realizada em espectrômetro de absorção atômica com chama (Thermo Scientific, iCE 3000 Series AAS) utilizando uma chama de ar-acetileno (absorção atômica 2,8, White Martins). As medições foram realizadas usando um comprimento de onda de 213,9 nm. As amostras foram diluídas usando um fator de 40x e, em seguida, foram introduzidas diretamente no AAS. A água deionizada foi acidificada e utilizada como branco. Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados analisando os parâmetros da curva analítica ( $R^2 = 0,9979$ ) (MILLER; MILLER, 2005). O LOD e o LOQ para zinco foram 0,08 e 0,28 mg Zn L<sup>-1</sup>, respectivamente.

As soluções-estoque de 3,4-dicloroanilina (Cl<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CAS 95-76-1, 98% de pureza, Sigma-Aldrich) foram preparadas em água do mar reconstituída (salinidade 30) e deixadas em ultrassom (UltraCleaner 1400, Unique) por 10 min. A determinação de 3,4-DCA nas soluções-estoque foi realizada por espectrofotômetro UV-Vis (GBC Scientific Equipment, GBC Cintra 6). Primeiramente, realizou-se uma varredura de comprimento de onda (200 - 800 nm; tamanho do passo 10 nm) para determinar o comprimento de onda com absorbância máxima ( $\lambda_{max}$ ) para 3,4-DCA em água do mar reconstituída. Dois picos (211 e 240,6 nm) foram observados e curvas analíticas foram construídas utilizando esses dois comprimentos de onda. A melhor curva foi

obtida no comprimento de onda de 240,6 nm ( $R^2 = 0,9990$ ). Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados analisando os parâmetros da curva analítica (MILLER; MILLER, 2005). O LOD e o LOQ para 3,4-DCA em água do mar reconstituída foram 0,73 e 2,43 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **4.2.4. Análises estatísticas**

Para avaliar a normalidade e homogeneidade da variância da distribuição dos dados, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando as análises indicaram que as suposições paramétricas foram atendidas, a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey foram utilizados para analisar os dados ( $p \leq 0,05$ ) e para determinar a concentração de efeito não observado (CENO). Uma vez que as análises indicaram que os dados eram não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas usando R (RSTUDIO TEAM, 2021).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Condições de exposição avaliadas para teste de toxicidade crônica

##### *Sobrevivência*

Analisando os dados de sobrevivência, na condição 1 houve sobrevida média de  $84,0 \pm 5,5\%$ , enquanto na condição 2 a sobrevivência média foi de  $74,0 \pm 21,3\%$ , conforme apresentado na tabela 2. De acordo com os normas utilizadas como referência, a sobrevivência média no controle deve ser  $\geq 80\%$  ao final do teste e nenhuma réplica com sobrevivência inferior a  $60\%$  (ASTM, 2014; USEPA, 2001). Em um estudo realizado com o anfípode estuarino *Corophium volutator*, para a aceitabilidade de testes de toxicidade crônica com sedimento, ao final do teste a sobrevivência no controle deve ser  $\geq 70\%$  (SCARLETT et al., 2007).

Para verificar a aceitabilidade de sobrevivência para *P. hawaiiensis*, outro experimento foi realizado (condição 3), o qual foi reproduzida a condição 1, que apresentou os melhores resultados. Na condição 3, obteve-se uma sobrevivência média de  $78,0 \pm 21,7\%$ , sendo que em uma das réplicas a sobrevivência foi de apenas  $40\%$ . A causa da alta mortalidade nesta réplica não foi identificada. Na condição 2, a alta mortalidade pode estar relacionada à variação da salinidade, no entanto na condição 3 essas condições foram otimizadas, e mesmo assim houve mortalidade maior do que a esperada em uma das réplicas. Os dados dos parâmetros físico-químicos podem ser visualizados na figura 1. Em um teste de toxicidade crônica com sedimento utilizando o anfípode *Leptocheirus plumulosus*, realizado pela USEPA, uma das réplicas apresentou  $0\%$  de sobrevivência. Como as demais réplicas apresentavam dados consistentes, essa réplica foi considerada uma anomalia e foi excluída das análises estatísticas (FISHER et al., 2001).

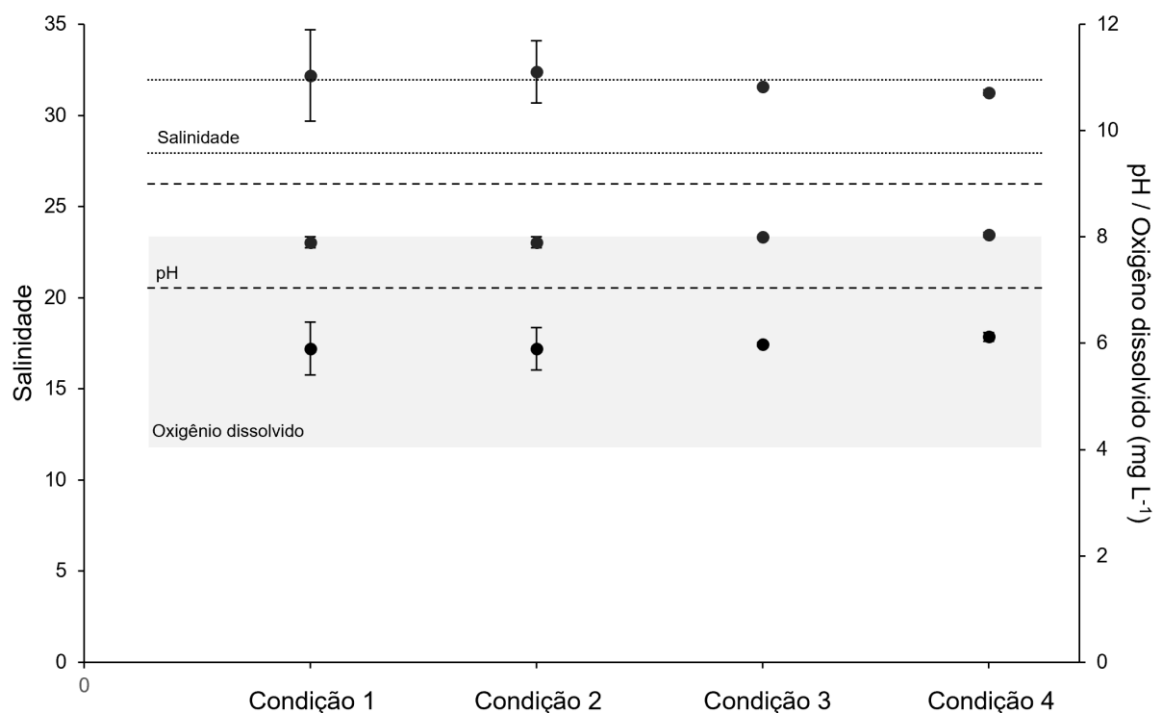
Nas condições 1 e 2, o teste durou 92 dias, e a idade inicial dos organismos foi  $\leq 14$  dias. De acordo com os dados obtidos nestes experimentos, observando os dias para a formação de casais e o tempo de embriogênese, decidiu-se iniciar o experimento posterior (condição 3) com organismos  $\leq 46$  dias de idade. Assim, o tempo de teste foi reduzido para 60 dias. Seguindo a otimização da condição de exposição, na condição 4, foram utilizados organismos com idade de  $\leq 52$  dias, e o tempo de teste foi reduzido para 40 dias, sendo possível observar a reprodução e o crescimento dos organismos, além de uma porcentagem de sobrevivência melhor, com média de  $84 \pm 13,6\%$  e mortalidade máxima de  $70\%$  por réplica, sendo a condição avaliada que apresentou os melhores resultados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sobrevivência (%) de *Parhyale hawaiiensis* ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída.

| Réplica           | Condição 1 | Condição 2 | Condição 3 | Condição 4 |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| 1                 | 90         | 70         | 80         | 70         |
| 2                 | 90         | 45         | 90         | 80         |
| 3                 | 80         | 65         | 90         | 100        |
| 4                 | 80         | 95         | 90         | 90         |
| 5                 | 80         | 95         | 40         | 80         |
| Média             | 84         | 74         | 78         | 84         |
| DP <sup>(a)</sup> | 5,5        | 21,3       | 21,7       | 11,4       |
| CV <sup>(b)</sup> | 6,5%       | 28,8%      | 27,8%      | 13,6%      |

<sup>(a)</sup> DP, desvio padrão; <sup>(b)</sup> CV, coeficiente de variação.

**Figura 1.** Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos para cada uma das condições de exposição testados com *Parhyale hawaiiensis*. As condições aceitas do meio para *P. hawaiiensis* foram: oxigênio dissolvido  $6 \pm 2$  mg L<sup>-1</sup> (caixa cinza claro), pH  $8 \pm 1$  (linhas tracejadas) e salinidade  $30 \pm 2$  (linhas pontilhadas), de acordo com Artal et al. (2018).





### Reprodução

Para avaliar a reprodução, o número de neonatos foi contado por 23 dias a partir do primeiro nascimento nas condições 1 e 3, e por 16 dias na condição 4. De acordo com USEPA 600/R-01/020 (USEPA, 2001) e ASTM E1367-03 (ASTM, 2014), a reprodução é expressa pelo número de descendentes por adulto vivo ao final do teste. Seguindo essa definição, na condição 1 houve média de  $3,8 \pm 1,2$  neonatos/organismo vivo, na condição 3, média de  $3,4 \pm 1,9$  neonatos/organismo vivo e na condição 4, média de  $2,6 \pm 0,5$  neonatos/organismo vivo (Tabela 3). O coeficiente de variação entre repetições, nas condições 1, 3 e 4, foi de 32,6%, 56,0% e 17,4%, respectivamente. De acordo com a norma USEPA 600/R-01/020, coeficientes de variação superiores a 30% são inadequados para detectar pequenas alterações nas respostas dos tratamentos em relação ao controle (USEPA, 2001). No entanto, em relatório apresentado pela USEPA sobre a avaliação da toxicidade crônica de sedimentos utilizando o anfípode *Leptocheirus plumulosus*, foi observada uma reprodução média de  $0,57 \pm 0,184$  neonatos/organismo vivo e um coeficiente de variação de 32,3% no controle, mostrando que é possível utilizar os dados com este valor de coeficiente de variação, pois foram observadas diferenças estatísticas em 3 amostras de sedimento diferentes em relação ao controle (FISHER et al., 2001).

Uma alternativa também utilizada para expressar a reprodução é a razão entre o número de recém-nascidos e o número de fêmeas vivas ao final do experimento (VAN DEN HEUVEL-GREVE et al., 2007). Na condição 1 houve uma média de  $7,2 \pm 1,2$  neonatos/fêmea, na condição 3 uma média de  $5,9 \pm 1,7$  neonatos/fêmea e na condição 4 uma média de  $4,4 \pm 0,8$  neonatos/fêmea (Tabela 3). Assim, o coeficiente de variação foi menor nos três experimentos, 17,0%, 29,9% e 17,8%, respectivamente. Para *P. hawaiiensis* essa forma de expressão do resultado foi mais adequada, pois ao final do teste é fácil identificar organismos machos e fêmeas. Em um estudo com *L. plumulosus*, a reprodução foi expressa em neonatos por fêmea, e a partir de 8 testes independentes, obteve-se uma média de  $11,8 \pm 3,6$  neonatos/fêmea, com coeficiente de variação médio de 30,5%, assim os critérios de validade de reprodução foram cumpridos (BARTLETT, 2017).

Quando expressada pela razão do número de neonatos pelo número de fêmeas vivas ao final do experimento, a reprodução se mostrou um bom *endpoint* para testes de toxicidade crônica com *P. hawaiiensis*, pois apresentou coeficiente de variação dentro do estabelecido pelas normas usadas como referência.

**Tabela 3.** Número de fêmeas e reprodução (expresso em neonatos/fêmea e neonatos/organismo vivo) de *Parhyale hawaiensis*, ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída.

| Réplica           | Condição 1       |                    |                |                         | Condição 3       |                    |                |                         | Condição 4       |                    |                |                         |
|-------------------|------------------|--------------------|----------------|-------------------------|------------------|--------------------|----------------|-------------------------|------------------|--------------------|----------------|-------------------------|
|                   | Número de fêmeas | Número de neonatos | Neonatos/fêmea | Neonatos/organismo vivo | Número de fêmeas | Número de neonatos | Neonatos/fêmea | Neonatos/organismo vivo | Número de fêmeas | Número de neonatos | Neonatos/fêmea | Neonatos/organismo vivo |
| 1                 | 3                | 19                 | 6,3            | 2,1                     | 5                | 30                 | 6,0            | 3,8                     | 4                | 19                 | 4,8            | 2,7                     |
| 2                 | 5                | 42                 | 8,4            | 4,7                     | 7                | 42                 | 6,0            | 4,7                     | 5                | 25                 | 5,0            | 3,1                     |
| 3                 | 6                | 33                 | 5,5            | 4,1                     | 4                | 15                 | 3,8            | 1,7                     | 5                | 26                 | 5,2            | 2,6                     |
| 4                 | 3                | 23                 | 7,7            | 2,9                     | 6                | 51                 | 8,5            | 5,7                     | 7                | 24                 | 3,4            | 2,7                     |
| 5                 | 5                | 40                 | 8,0            | 5,0                     | 1                | 5                  | 5,0            | 1,3                     | 4                | 15                 | 3,8            | 1,9                     |
| Média             |                  |                    | 7,2            | 3,8                     |                  |                    | 5,9            | 3,4                     |                  |                    | 4,4            | 2,6                     |
| DP <sup>(a)</sup> |                  |                    | 1,2            | 1,2                     |                  |                    | 1,7            | 1,9                     |                  |                    | 0,8            | 0,5                     |
| CV <sup>(b)</sup> |                  |                    | 17,0%          | 32,6%                   |                  |                    | 29,9%          | 56,0%                   |                  |                    | 17,8%          | 17,4%                   |

<sup>(a)</sup> DP, desvio padrão; <sup>(b)</sup> CV, coeficiente de variação.

### Crescimento

A taxa de crescimento pode ser expressa pelo peso médio ganho por dia por adulto sobrevivente ao final do teste (ASTM, 2014; BARTLETT, 2017; CASTRO et al., 2006; SCARLETT et al., 2007; USEPA, 2001) ou pelo comprimento médio por dia por adulto sobrevivente ao final do teste (ASTM, 2014; USEPA, 2001; VAN DEN HEUVEL-GREVE et al., 2007). No presente estudo, optou-se por medir o comprimento dos organismos. A taxa foi calculada pelo comprimento do organismo vivo no final do teste - o comprimento do organismo no início do teste dividido pela duração do teste.

No primeiro experimento, o comprimento médio inicial dos organismos foi de  $2,761 \pm 0,259$  mm ( $n = 20$ ). Esse valor foi obtido a partir do comprimento de um grupo de 20 organismos de um experimento adicional, com idade  $\leq 14$  dias, para não gerar nenhum tipo de estresse aos organismos que foram utilizados no experimento. A taxa média de crescimento obtida na condição 1 ao final do experimento foi de  $0,071 \pm 0,003$  mm/organismo/dia com coeficiente de variação de 3,6% (Tabela 4).

Na condição 3, o comprimento inicial dos organismos foi de  $6,436 \pm 0,391$  mm ( $n = 20$ ). Este valor foi obtido da mesma forma descrita acima, mas com organismos  $\leq 47$  dias de idade. A taxa média de crescimento obtida na condição 3 ao final do experimento foi de  $0,043 \pm 0,008$  mm/organismo/dia com coeficiente de variação de 19,2% (Tabela 4). Para a condição 4, usando organismos com  $\leq 52$  dias de idade, o comprimento inicial dos organismos foi de  $7,093 \pm 0,688$

mm ( $n = 9$ ). A taxa média de crescimento obtida na condição 4 ao final do experimento foi de  $0,067 \pm 0,004$  mm/organismo/dia e coeficiente de variação de 5,4% (Tabela 4). Portanto, foi possível verificar que o crescimento foi um bom *endpoint* para testes de toxicidade crônica utilizando *P. hawaiiensis*, pois apresentou um coeficiente de variação dentro do estabelecido pelas normas utilizadas como referência.

**Tabela 4.** Taxa média de crescimento (mm/organismo/dia) de *Parhyale hawaiiensis* ao final das diferentes condições de exposição avaliadas, para cada réplica em água do mar reconstituída.

| Réplica           | Condição 1 | Condição 3 | Condição 4 |
|-------------------|------------|------------|------------|
| 1                 | 0,069      | 0,053      | 0,071      |
| 2                 | 0,069      | 0,042      | 0,071      |
| 3                 | 0,070      | 0,050      | 0,065      |
| 4                 | 0,074      | 0,038      | 0,066      |
| 5                 | 0,074      | 0,033      | 0,063      |
| Média             | 0,071      | 0,043      | 0,067      |
| DP <sup>(a)</sup> | 0,003      | 0,008      | 0,004      |
| CV <sup>(b)</sup> | 3,6%       | 19,2%      | 5,4%       |

<sup>(a)</sup> DP, desvio padrão; <sup>(b)</sup> CV, coeficiente de variação.

#### 4.3.2. Protocolo de teste de toxicidade crônica proposto

Observando os dados obtidos para todos os *endpoints*, bem como os desvios-padrão e coeficientes de variação, a melhor condição de exposição obtida foi a condição 4. Assim, os testes foram realizados com *P. hawaiiensis*  $\leq 52$  dias de idade, em recipiente plástico, contendo 5 g de coral triturado (granulometria #8, Nature's Ocean), 100 mL de meio (água do mar reconstituída, salinidade 30) e 10 organismos por recipiente usando 5 réplicas por concentração. O meio foi parcialmente renovado três vezes por semana, seguido de alimentação com 0,003 g de alimento em pastilha (Novo fect, JBL) por réplica. A duração do teste foi de 42 dias, a  $24 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas e aeração constante. Na tabela 5, pode ser observado um resumo dos parâmetros dos testes de toxicidade crônica das normas utilizadas como referência (ASTM e EPA) e os parâmetros do teste de toxicidade crônica com *P. hawaiiensis* estabelecidos pelo presente estudo.

É possível identificar machos e fêmeas sexualmente maduros de *P. hawaiiensis* visualmente quando eles formam amplexo para acasalamento (ver figura 1, página 18), neste momento os machos agarram e seguram as fêmeas menores com seus gnatópodos (BROWNE et al., 2005).

Nos testes foi possível observar pares de acasalamento entre 8-10 semanas de idade, próximo ao relatado pela literatura de aproximadamente 6 semanas após o nascimento (EXTAVOUR, 2005). O desenvolvimento embrionário de *P. hawaiiensis* nos testes levou em média 12,5 dias a 24 °C, concordando com a literatura que relata entre 12 e 14 dias a 25 °C (EXTAVOUR, 2005). Em relação à taxa de reprodução não houve diferença estatística significativa entre os controles, e a média obtida para cada controle teste foi de  $2,9 \pm 0,5$  neonatos/fêmea, poder ser estabelecido mais um valor para aceitabilidade para o teste. A taxa de crescimento foi o único *endpoint* a mostrar diferença estatística entre os controles, portanto, selecionamos as taxas de crescimento máxima e mínima obtidas dos quatro controles para estabelecer uma faixa de crescimento de aceitabilidade do teste (0,04 a 0,09 mm/dia).

Um resumo dos resultados dos testes de toxicidade crônica com zinco e *P. hawaiiensis* foi apresentado na figura 2. No teste 1, observou-se 0% de sobrevivência nas maiores concentrações (0,6 e 2 mg Zn L<sup>-1</sup>), e nas demais concentrações (0,02; 0,06; 0,2 mg Zn L<sup>-1</sup>) não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle. No teste 2, foi observada diferença significativa na sobrevivência apenas na concentração mais alta (0,4 mg Zn L<sup>-1</sup>) em relação ao controle, portanto não foi incluída nas análises estatísticas dos demais *endpoints*.

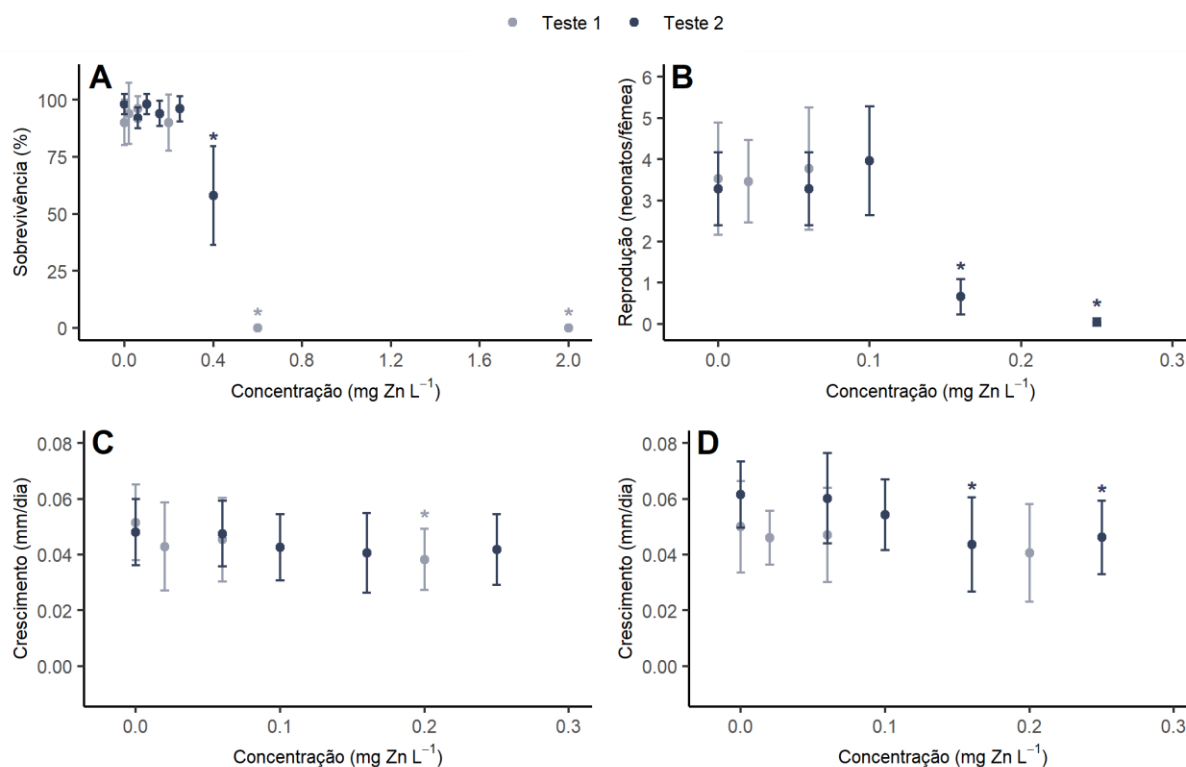
A reprodução foi medida pelo número de neonatos por fêmea. No teste 1, nas concentrações 0,02 e 0,06 mg Zn L<sup>-1</sup>, não houve diferença significativa em relação ao controle e, na concentração de 0,2 mg Zn L<sup>-1</sup> não ocorreram nascimentos, portanto a concentração de efeito não observado (CENO) foi de 0,06 mg Zn L<sup>-1</sup>. No teste 2, houve diferenças significativas nas concentrações 0,16 e 0,25 mg Zn L<sup>-1</sup>, assim a CENO obtida foi de 0,10 mg Zn L<sup>-1</sup>.

Para o *endpoint* crescimento, primeiramente analisou-se a significância do gênero nas respostas, e dos 4 testes realizados (zinco e 3,4-DCA), 3 deles apresentaram diferença significativa na taxa de crescimento entre machos e fêmeas. Portanto, os testes foram analisados para machos e fêmeas separadamente. No teste 1, para fêmeas a concentração de 0,2 mg Zn L<sup>-1</sup> foi significativamente diferente do controle, portanto a CENO foi igual a 0,06 mg Zn L<sup>-1</sup>. Para os machos não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações. No teste 2, não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações para as fêmeas e para os machos houve diferenças significativas nas concentrações 0,16 e 0,25 mg Zn L<sup>-1</sup>, assim a CENO obtida foi de 0,10 mg Zn L<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.** Comparação dos métodos de testes de toxicidade crônica com anfípodes marinhos.

| Parâmetro                              | Método | ASTM E1367-03 e  | Presente estudo   |
|--|--------|--|---|
|  |        | USEPA 600/R-01/020   |   |
| Espécie                                |        | <i>Leptocheirus plumulosus</i>   | <i>Parhyale hawaiensis</i>  |
| Fonte                                  |        | Cultura de laboratório   | Cultura de laboratório  |
| Idade e tamanho inicial dos organismos |        | < 48 h (0,25 – 0,60 mm)  | ≤ 52 dias (0,50 – 0,70 mm)  |
| Recipiente-teste                       |        | Becker de 1 L  | Potes de 125 mL   |
| Volume de amostra por réplica          |        | 150 g (2 cm profundidade) de camada de sedimento e 775 mL de água do mar   | 5 g de coral triturado e 100 mL de água do mar reconstituída  |
| Número de réplicas                     |        | 5  | 5   |
| Organismos por réplica                 |        | 20   | 10  |
| Temperatura                            |        | 25 ± 2 °C  | 24 ± 2 °C   |
| Fotoperíodo                            |        | 16 h luz : 8 h escuro  | 12 h luz : 12 h escuro  |
| Renovação do meio de teste             |        | 3 vezes na semana: sifonagem e reposição de 400 mL   | 3 vezes na semana: sifonagem e reposição de 50 mL   |
| Dieta                                  |        | Dias 0 a 13, 20 mg Tetramarine por réplica; Dias 14 a 28, 40 mg Tetramarine por réplica                              | Dias 0 a 42, 3 mg de comida em pastilha Novo fect, JBL por réplica  |
| Alimentação                            |        | 3 vezes na semana após renovação do meio de teste  | 3 vezes na semana após renovação do meio de teste   |
| Aeração                                |        | Aerado constantemente com fluxo lento de bolhas  | Aerado constantemente com fluxo lento de bolhas   |
| Duração do teste                       |        | 28 dias  | 42 dias   |
| Endpoints                              |        | Sobrevivência, reprodução e taxa de crescimento  | Sobrevivência, reprodução e taxa de crescimento   |
| Aceitabilidade do teste                |        | Sobrevivência média mínima no controle de 80%, crescimento e reprodução mensuráveis em todas as réplicas de controle | Sobrevivência média mínima no controle de 80%, reprodução média mínima de 2,9 ± 0,5 neonatos/fêmea por réplica do controle e crescimento na faixa de 0,04 a 0,09 mm/dia no controle |

**Figura 2.** Efeitos do zinco na sobrevivência (A), reprodução (B) e crescimento (C, fêmea e D, macho) de *Parhyale hawaiiensis*. Cada ponto representa a média (com desvio padrão) das cinco réplicas de cada concentração, incluindo o controle.



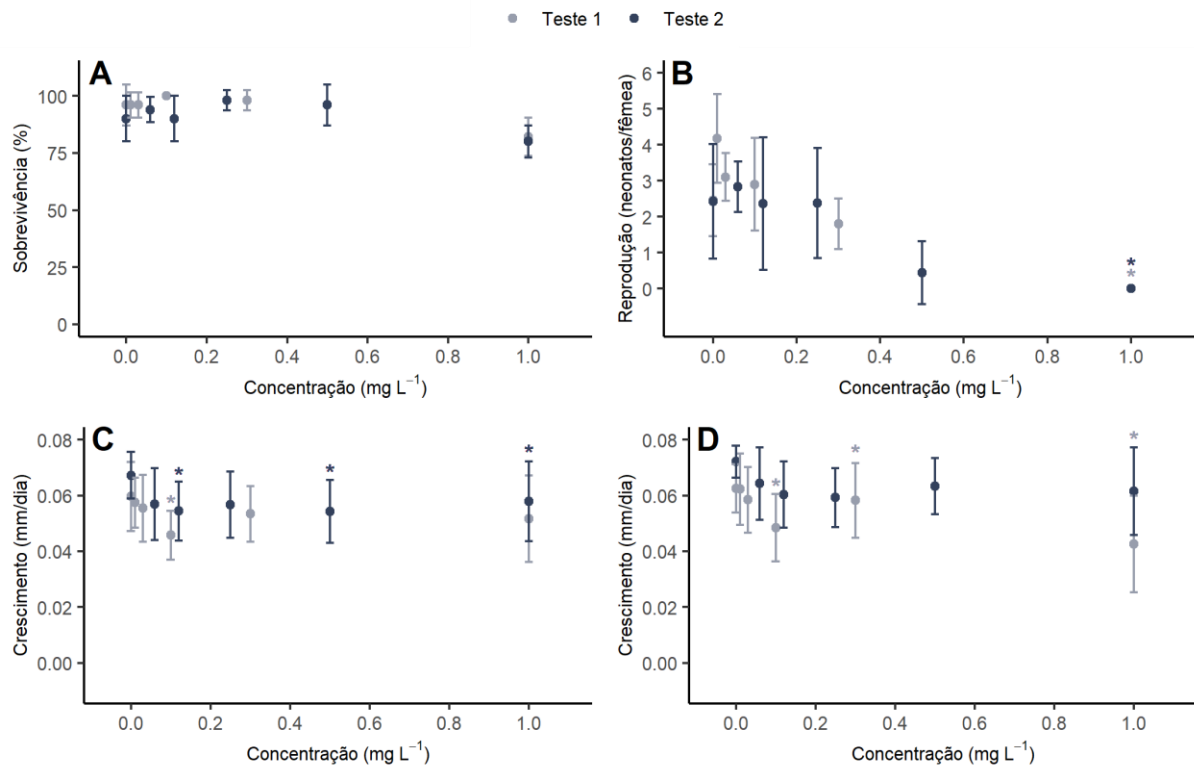
\* Indica pontos significativamente diferentes do controle.

As respostas para a exposição crônica de *P. hawaiiensis* ao 3,4-DCA podem ser observadas na figura 3. Nos testes 1 e 2 não houve diferença significativa na sobrevivência em nenhuma concentração em relação ao controle, portanto todas as concentrações foram incluídas nas análises estatísticas dos outros *endpoints*. Para a reprodução, em ambos os testes (1 e 2), na concentração mais alta (1 mg L<sup>-1</sup>) não ocorreram nascimentos, e nas demais concentrações não foi observada diferença estatística significativa. Assim, as CENO obtidas foram 0,3 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> para os testes 1 e 2, respectivamente.

No teste 1, em relação ao *endpoint* de crescimento, não foi observada relação de concentração-resposta para as fêmeas. Todas as concentrações testadas não foram significativamente diferentes do controle (exceto a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>), portanto a CENO não pôde ser calculada. Para os machos, observou-se uma relação concentração-resposta, com diferenças significativas nas três maiores concentrações (0,1; 0,3 e 1 mg L<sup>-1</sup>) em relação ao controle, portanto a CENO obtida foi de 0,03 mg L<sup>-1</sup>. No teste 2, para as fêmeas, novamente não foi observada relação concentração-resposta, pois houve diferenças significativas nas concentrações de 0,12; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> e não significativas nas concentrações

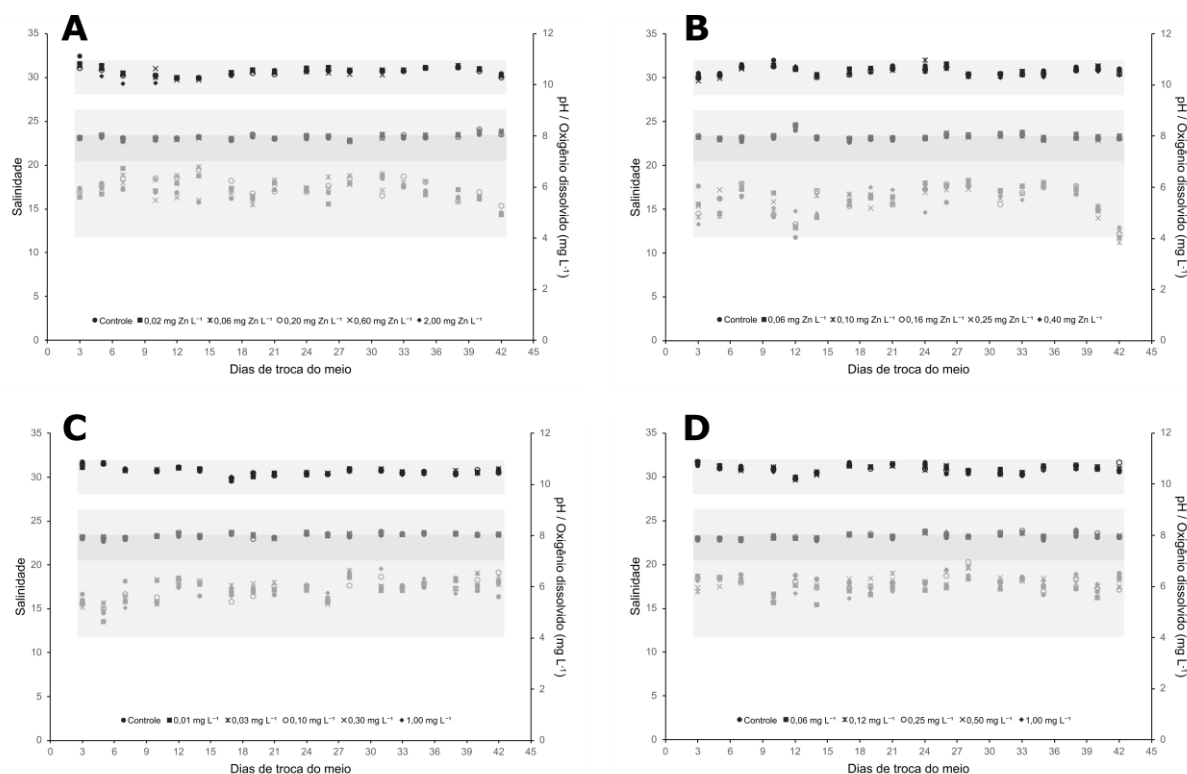
0,06 e 0,25 mg L<sup>-1</sup>, em comparação ao controle. Logo, o valor de CENO não foi calculado. Para os machos não houve diferença estatística em todas as concentrações testadas em relação ao controle, então a CENO foi > 1 mg L<sup>-1</sup>. Os parâmetros físico-químicos de todos os testes podem ser observados na figura 4.

**Figura 3.** Efeitos da 3,4-dicloroanilina na sobrevivência (A), reprodução (B) e crescimento (C, fêmea e D, macho) de *Parhyale hawaiiensis*. Cada ponto representa a média (com desvio padrão) das cinco réplicas de cada concentração, incluindo controle.



\* Indica pontos significativamente diferentes do controle.

**Figura 4.** Parâmetros físico-químicos dos testes de toxicidade crônica com zinco (testes 1 (A) e 2 (B)) e 3,4-dicloroanilina (testes 1 (C) e 2 (D)) com *Parhyale hawaiiensis* (a).



(a) Os parâmetros foram medidos a cada dia de renovação do meio em uma réplica aleatória de cada concentração. As condições aceitas para as soluções-teste de *P. hawaiiensis* foram oxigênio dissolvido  $6 \pm 2$  mg L<sup>-1</sup>, pH  $8 \pm 1$  e salinidade  $30 \pm 2$  (caixas cinza-claro), de acordo com Artal et al. (2018).

O *endpoint* de reprodução foi mais reprodutível do que o *endpoint* de crescimento, pois foram observadas relações concentração-resposta claras para ambas as substâncias testadas, permitindo o cálculo dos valores de CENO para reprodução. Gale et al. (2006) também observaram a mesma variabilidade no *endpoint* de crescimento e sugeriram que a fertilidade era o *endpoint* mais sensível e prático para medir no teste de toxicidade crônica com sedimentos utilizando o anfípode estuarino *Melita plumulosa*. Segundo a USEPA (2001), após análise dos dados de desempenho intralaboratorial e precisão interlaboratorial para *L. plumulosus*, no teste de toxicidade de sedimento de 28 dias de exposição, verificou-se variações nos *endpoints* de crescimento e reprodução, porém segundo os autores, espera-se que essa variação diminua ao longo do tempo à medida que o laboratório ganha experiência ao utilizar o método. Assim, o mesmo poderia ocorrer com as variações obtidas nos testes com *P. hawaiiensis*, além disso, sugerimos que mais estudos sejam realizados para verificar se o aumento do tempo de exposição seria adequado para avaliar a taxa de crescimento como *endpoint*.



Comparando os dados obtidos neste estudo com dados de toxicidade crônica da literatura, os valores de CENO para *P. hawaiiensis* estão na mesma ordem de magnitude relatados para outros anfípodes para Zn e 3,4-DCA, conforme mostrado na tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação dos valores de concentração de efeito não observado (CENO) para zinco e 3,4-dicloroanilina obtidos nos testes de toxicidade crônica com *Parhyale hawaiiensis* realizados neste trabalho e outros anfípodes de água doce e do mar.

| <b>Espécie</b>                | <b>Ambiente aquático</b> | <b>Endpoint</b>           | <b>CENO<sup>(a)</sup><br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b>        | <b>Referência</b>         |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| <b>Zinco</b>                  |                          |                           |  |                           |
| <i>Corophium volutator</i>    | Marinho                  | Reprodução<br>Crescimento | < 0,2  | Conradi e Depledge (1999) |
| <i>Hyalella azteca</i>        | Doce                     | Reprodução<br>Crescimento | 0,024<br>0,048   | Wang et al. (2020)        |
| <i>Parhyale hawaiiensis</i>   | Marinho                  | Reprodução<br>Crescimento | 0,06 e 0,10 <sup>(b)</sup><br>0,06 e 0,10 <sup>(c)</sup> | Presente estudo           |
| <b>3,4-dicloroanilina</b>     |                          |                           |  |                           |
| <i>Chaetogammarus marinus</i> | Marinho                  | Reprodução                | < 0,032  | Adema e Vink (1981)       |
| <i>Gammarus pulex</i>         | Doce                     | Crescimento               | 0,08   | Taylor et al. (1994)      |
| <i>Parhyale hawaiiensis</i>   | Marinho                  | Reprodução<br>Crescimento | 0,3 e 0,5 <sup>(b)</sup><br>0,03 <sup>(d)</sup>          | Presente estudo           |

<sup>(a)</sup> CENO, concentração de efeito não observado;

<sup>(b)</sup> Valores de CENO obtidos nos testes 1 e 2, respectivamente;

<sup>(c)</sup> Valores de CENO obtidos do primeiro teste para fêmeas e do segundo teste para machos, respectivamente;

<sup>(d)</sup> Valor de CENO obtido do primeiro teste para machos.

De acordo com o Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) da Agência Europeia de Produtos Químicos, são necessárias informações ecotoxicológicas para substâncias, incluindo testes de toxicidade de curto e longo prazo em organismos representativos e de diferentes níveis tróficos (algas, crustáceos e espécies de peixes) (ECHA, 2011). De acordo com Wheeler et al. (2002), o número de testes com organismos de água do mar é menor do que com organismos de água doce, tornando a avaliação de risco mais difícil para o ambiente marinho. Para o cálculo da concentração prevista sem

efeito (PNEC), usada nas avaliações de risco toxicológico, podem ser usados dados de toxicidade aguda e crônica. Porém, os dados de toxicidade de longo prazo podem fornecer cálculos mais confiáveis, pois são aplicados fatores de avaliação menores (TOMA et al., 2021). Assim, o teste de toxicidade crônica utilizando *P. hawaiiensis* pode ser uma ferramenta importante na determinação de PNEC's para ambientes marinhos tropicais.

A maioria dos testes de toxicidade (aguda e crônica) realizados com espécies marinhas tropicais no Brasil, utilizam organismos coletados em campo (CESAR et al., 2006; MOLISANI et al., 2013; MOREIRA et al., 2021; PUSCEDDU et al., 2007). Organismos cultivados em laboratório apresentam diversas vantagens, como grande número de organismos para testes (NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002), além da utilização de organismos de idade conhecida e livres de contaminação (VACCHI et al., 2019). Segundo Costa et al. (2005), o potencial para cultivo é certamente um dos pontos fortes mais importantes para tornar uma espécie boa candidata para testes de toxicidade. *P. hawaiiensis* é cultivada com sucesso em laboratório de ecotoxicologia desde 2010 (ARTAL et al., 2018) e vários estudos ecotoxicológicos já foram realizados com essa cultura (ARTAL et al., 2018, 2019, 2020; DIEHL et al., 2021; DOS SANTOS et al., 2022; VACCHI et al., 2019; VANNUCI-SILVA et al., 2018, 2019). Assim, o teste de toxicidade crônica com *P. hawaiiensis* proposto no presente estudo pode ser considerado uma ferramenta promissora que pode ser incluída nas avaliações de risco ecológico de ambientes marinhos.

#### **4.3.3. Análise química das soluções-estoque**

As concentrações das soluções-estoque de zinco permaneceram dentro de 97-102% da concentração nominal. De acordo com a Diretriz da OECD n. 23, as concentrações das soluções-teste devem permanecer dentro de 80-120% da concentração nominal (OECD, 2019), portanto, as concentrações de efeito podem ser expressas em relação às concentrações nominais. Assim, as concentrações das soluções-estoque de zinco não ultrapassaram os valores estabelecidos pela diretriz, possivelmente as soluções-teste também não sofreram alteração em suas concentrações. Além disso, em condições usuais, o erro relativo de uma análise AAS é na ordem de 1 a 2% (SKOOG et al., 2006). As concentrações das soluções-estoque de 3,4-DCA permaneceram dentro de 80-126% da concentração nominal, portanto assumimos que as soluções-teste também não sofreram alteração em suas concentrações.

#### 4.4. CONCLUSÕES

As condições para o teste de toxicidade crônica foram definidas e aplicadas para avaliar a toxicidade de duas substâncias de referência, zinco e 3,4-DCA. Os *endpoints* de sobrevivência e reprodução se mostraram adequados, porém o *endpoint* de crescimento ainda requer estudos adicionais. O teste de toxicidade crônica desenvolvido pode ser considerado uma ferramenta promissora para caracterização dos efeitos adversos de substâncias, misturas ou amostras ambientais, e pode ser incluído em avaliações de risco ecológico de ambientes marinhos.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR15638:2021 Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos.** Rio de Janeiro, Brasil, 2021.
- ADEMA, D. M. M.; VINK, I. G. J. A comparative study of the toxicity of 1,1,2-trichloroethane, dieldrin, pentachlorophenol and 3,4 dichloroaniline for marine and fresh water organisms. **Chemosphere**, v. 10, n. 6, p. 533–554, jan. 1981.
- ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 15 mar. 2018.
- ARTAL, M. C. et al. Toxicity responses for marine invertebrate species of brazilian occurrence. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 14, n. 1, p. 15–25, 27 ago. 2019.
- ARTAL, M. C. et al. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113963, maio 2020.
- ASTM. **E1367-03: Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates.** West Conshohocken: ASTM International, 2014. Disponível em: <[<http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E1367-03\(2014\)>](http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E1367-03(2014))>
- BARTLETT, J. **Control Survival, Growth And Reproduction Of The Marine Amphipod *Leptocheirus Plumulosus* In A Flow-Through Test System.** Easton: EAG Laboratories, 2017.
- BROWNE, W. E. et al. Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. **Genesis**, v. 42, n. 3, p. 124–149, 2005.
- CASTRO, H. et al. Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: An example from Ria de Aveiro, NW Portugal. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 1–4, p. 91–99, jan. 2006.
- CESAR, A. et al. Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system- Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, n. 1, p. 55–63, mar. 2006.
- CONRADI, M.; DEPLEDGE, M. Effects of zinc on the life-cycle, growth and reproduction of the marine amphipod *Corophium volutator*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 176, p. 131–138, 1999.
- COSTA, F. O. et al. Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. **Marine Environmental Research**, v. 60, n. 1, p. 93–110, jul. 2005.
- DEWITT, T. H. et al. **Development of a Chronic Sediment Toxicity Test for Marine Benthic Amphipods.** Newport: U.S. Environmental Protection Agency, 1992. Disponível em: <[<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939400770241>](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222939400770241)>
- DIEHL, O. J. et al. Antenna regeneration as an ecotoxicological endpoint in a marine amphipod: a proof of concept using dimethyl sulfoxide and diflubenzuron. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 751–755, 26 maio 2021.
- DOS SANTOS, A. et al. Measuring concentrations of a dye in the hemolymph of a marine amphipod: Development of a protocol for exposure assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, n. October 2021, p. 113376, fev. 2022.
- ECHA. **3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA) - Summary Risk Assessment Report.** Dortmund, Germany:

- European Chemicals Agency, 2006.
- ECHA. **Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.2: Framework for generation of information on intrinsic properties.** Helsinki, Finland: European Chemicals Agency, 2011.
- EXTAVOUR, C. G. The fate of isolated blastomeres with respect to germ cell formation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. **Developmental Biology**, v. 277, n. 2, p. 387–402, 2005.
- FISHER, D. J. et al. **Application of the 10-d Acute and 28-d Chronic *Leptocheirus Plumulosus* Sediment Toxicity Tests to the Ambient Toxicity Assessment Program: Final Report.** Annapolis: [s.n.].
- GALE, S. A.; KING, C. K.; HYNE, R. V. Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): evaluation using metal-spiked and field-contaminated sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1887, 2006.
- KING, C. K. et al. Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1466–1476, jun. 2006.
- MANYIN, T.; ROWE, C. L. Chronic exposure of *Leptocheirus plumulosus* to Baltimore Harbor sediment: Bioenergetic and population-level effects. **Marine Environmental Research**, v. 62, n. 2, p. 116–130, ago. 2006.
- MELO, S. L. R.; NIPPER, M. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyischnopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p. 412–420, mar. 2007.
- MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry.** 5th. ed. Edinburgh Gate: Pearson Education Limited, 2005.
- MOLISANI, M. M. et al. Acute Toxicity Bioassay with the Amphipod, *Grandidierella bonnieroides* S. After Exposure to Sediments from an Urban Estuary (Macaé River Estuary, RJ, Brazil). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 79–84, 3 jan. 2013.
- MOREIRA, L. B. et al. Sediment contamination and toxicity of Marine Protected Areas in southeastern Brazilian coast: A baseline for management planning. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, n. May, p. 112613, set. 2021.
- NASCIMENTO, I. A. Key issues on sediment quality assessment: A review of South American research with emphasis on Brazil. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 1, p. 9–22, mar. 2007.
- NEUPARTH, T.; COSTA, F. O.; COSTA, M. H. Effects of Temperature and Salinity on Life History of the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. Implications for Ecotoxicological Testing. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 61–73, 2002.
- OECD. **Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures.** [s.l.] OECD, 2019. v. 23
- PARIS, M. et al. **Chapter Eight - The crustacean model *Parhyale hawaiiensis*.** In: BOB, G.; SRIVASTAVA, M. (Eds.). *Emerging Model Systems in Developmental Biology.* [s.l.] Current Topics in Developmental Biology, v. 147, 2022. p. 199–230.
- PODLESIŃSKA, W.; DĄBROWSKA, H. Amphipods in estuarine and marine quality assessment – a review. **Oceanologia**, v. 61, n. 2, p. 179–196, abr. 2019.
- POOVACHIRANON, S.; BOTO, K.; DUKE, N. Food preference studies and ingestion rate measurements of the mangrove amphipod *Parhyale hawaiiensis* (Dana). **Journal of Experimental**

- Marine Biology and Ecology**, v. 98, n. 1–2, p. 129–140, jan. 1986.
- PUSCEDDU, F. H. et al. Avaliação da Toxicidade do Sedimento do Complexo Estuarino de Santos Empregando Ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 237–242, 10 dez. 2007.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MARStudio, PBC, , 2021. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SCARLETT, A. et al. Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants using the amphipod *Corophium volutator*. **Marine Environmental Research**, v. 63, n. 5, p. 457–470, jun. 2007.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.
- SHOEMAKER, C. R. Observations on the Amphipod Genus *Parhyale*. **Proceedings of the United States National Museum**, v. 106, n. 3372, p. 345–358, 1956.
- SKOOG, D. A. et al. Capítulo 28 - Espectroscopia Atômica. In: **Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana**. 8ª Edição ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006. p. 796–829.
- TARARAM, A. S.; WAKABARA, Y.; LEITE, F. P. P. Notes on *Parhyale hawaiiensis* (Dana), Crustacea-Amphipoda. **Bulletin of Marine Science**, v. 28, n. 4, p. 782–786, 1978.
- TAYLOR, E. J. et al. Effects of 3,4-dichloroaniline on the growth of two freshwater macroinvertebrates in a stream mesocosm. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 29, n. 1, p. 80–85, out. 1994.
- TOMA, C. et al. New Models to Predict the Acute and Chronic Toxicities of Representative Species of the Main Trophic Levels of Aquatic Environments. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6983, 19 nov. 2021.
- USEPA. **Guidelines for Ecological Risk Assessment (EPA/630/R-95/002F)** U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC, USA, abr. 1998. Disponível em: <<https://www.epa.gov/risk/guidelines-ecological-risk-assessment>>
- USEPA. **600/R-01/020: Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-associated Contaminants with the Amphipod *Leptocheirus Plumulosus*, First Edition**. U.S. Environmental Protection Agency, 2001.
- VACCHI, F. I. et al. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, n. April, p. 110658, dez. 2019.
- VAN DEN HEUVEL-GREVE, M. et al. A chronic bioassay with the estuarine amphipod *Corophium volutator*: Test method description and confounding factors. **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1301–1309, 2007.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. Higher silver bioavailability after nanoparticle dietary exposure in marine amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 806–810, 19 abr. 2019.
- WANG, N. et al. Evaluation of Acute and Chronic Toxicity of Nickel and Zinc to 2 Sensitive Freshwater Benthic Invertebrates Using Refined Testing Methods. **Environmental Toxicology and**

**Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2256–2268, 2020.

WHEELER, J. R. et al. Freshwater to saltwater toxicity extrapolation using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2459–2467, nov. 2002.

# Capítulo 2



*Neste capítulo foram apresentados os resultados referentes a caracterização dos hemócitos da hemolinfa de Parhyale hawaiensis.*



## 5.1. INTRODUÇÃO

A imunotoxicologia é considerada uma disciplina relativamente jovem dentro das ciências ambientais, e considerada de grande importância devido à alta sensibilidade do sistema imunológico aos contaminantes, tornando-a uma peça essencial no campo da toxicologia aquática (BROUSSEAU; FOURNIER, 2013). O sistema imunológico dos invertebrados é relativamente simples, quando comparado com o sistema complexo dos vertebrados, fazendo-o acessível para o monitoramento dos efeitos dos contaminantes ambientais e as complexas interações que afetam a resistência do hospedeiro (GALLOWAY; DEPLEDGE, 2001). Para o desenvolvimento de estudos imunotoxicológicos é necessário o conhecimento da fisiologia do organismo-teste (BROUSSEAU; FOURNIER, 2013).

Hemócitos de crustáceos e anfípodes desempenham um papel importante no sistema imunológico do organismo, atuando no reconhecimento de patógenos ou xenobióticos, fagocitose, melanização, citotoxicidade e comunicação célula-célula (JOHANSSON et al., 2000). Apesar da importância dessas células, não há consenso quanto aos tipos de hemócitos existentes. A falta de guias confiáveis, esquemas lógicos de classificação e de métodos apropriados para amostragem e análise de dados são considerados as principais dificuldades no estabelecimento de um padrão para a identificação de hemócitos de crustáceos (BAUCHAU, 1981).

Basicamente, os hemócitos são divididos em três grupos principais: granulócitos, com muitos grânulos evidentes no citoplasma; semi-granulócitos, com menos grânulos; hialinócitos, sem grânulos (BATTISTELLA; BONIVENTO; AMIRANTE, 1996; MATOZZO; MARIN, 2010a, 2010b). Segundo Bauchau (1981), que sintetizou as principais características de cada tipo de hemócito em crustáceos, os hialinócitos são células pequenas com um grande núcleo central circundado por uma franja de citoplasma basófilo com poucos ou nenhum grânulo, e em preparações de lâminas não fixadas, geralmente exibem extensões pseudopodiais. Já os granulócitos são as células maiores, com núcleo pequeno, excêntrico e em forma de rim, elas possuem ribossomos livres espalhados por toda a célula preenchidos com grandes grânulos, que normalmente são acidófilos, enquanto o citoplasma é basófilo. Os semi-granulócitos são o tipo celular intermediário com núcleo de tamanho médio que pode ser central ou excêntrico, com formato esférico ou reniforme, possuem dois ou mais complexos de Golgi que produzem um número considerável de grânulos eosinófilos, que se distribuem esparsamente no citoplasma, e fagossomos (BAUCHAU, 1981).

Os anfípodes são amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos (ANDERSON et al., 2004; INGERSOLL et al., 2002; WANG; ZAUKE, 2004; WEBER et al., 2013), e alguns desses são realizados utilizando os hemócitos dos organismos-teste como, por exemplo, no ensaio do cometa (BOTELHO et al., 2022; LACAZE et al., 2010; RONCI et al., 2015). Porém, estes estudos têm sido realizados sem a devida identificação ou descrição correta das células. Apenas os hemócitos do anfípode de água doce *Echinogammarus stammeri* foram brevemente descritos (DEZFULI et al., 2008).

Devido ao crescente interesse no uso do anfípode marinho *P. hawaiiensis* em ecotoxicologia (ARTAL et al., 2018, 2019, 2020; DOS SANTOS et al., 2022; VACCHI et al., 2019; VANNUCI-SILVA et al., 2018, 2019) e em outras ciências (PARIS et al., 2022; REHM et al., 2009), o objetivo do presente estudo foi realizar a descrição e identificação dos hemócitos da hemolinfa desta espécie. Os estudos foram realizados em cooperação com o Prof. Dr. Vicente Gomes e com a Dra. Marina Tenório Botelho, do Instituto Oceanográfico e com o Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva e seu aluno Ms. Willian Reina Joviano do Instituto de Ciências Biomédicas, ambos institutos da Universidade de São Paulo (USP).

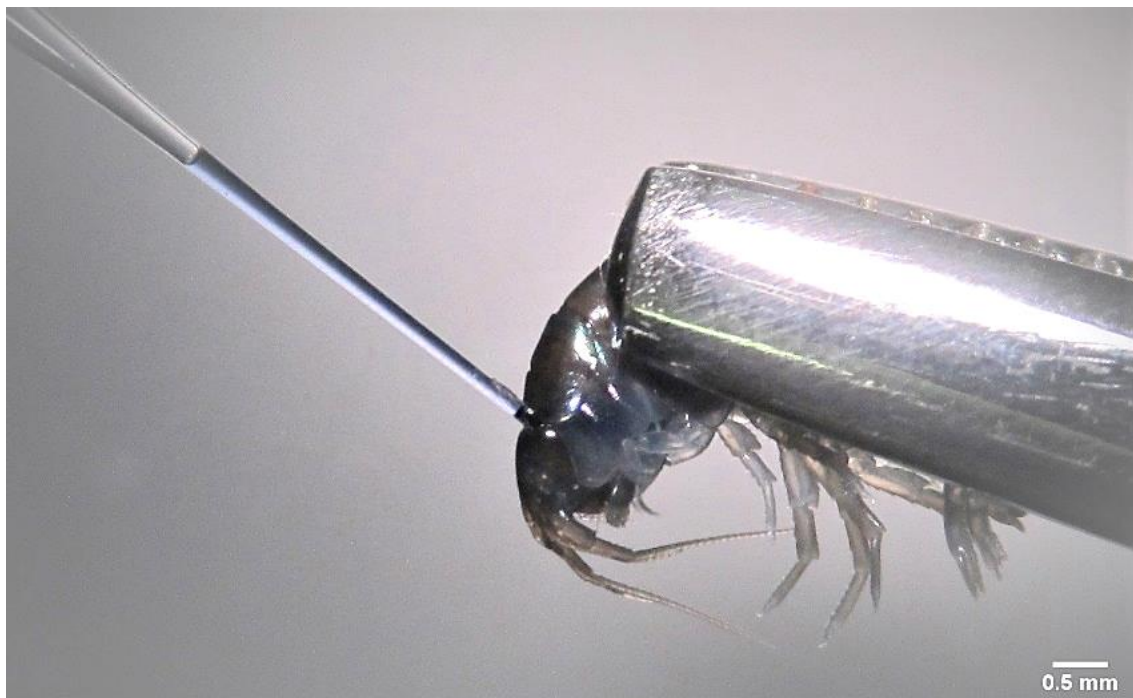
## 5.2. METODOLOGIA

### 5.2.1. Caracterização dos hemócitos de *P. hawaiiensis* utilizando lâminas citológicas

Diferentes técnicas de coloração foram testadas para permitir uma melhor visualização dos hemócitos ao microscópio, e viabilizar a identificação do tipo celular. Um *pool* de hemolinfa coletado de dois organismos adultos (machos e fêmeas, separadamente) foi diluído em 100  $\mu$ L de um anticoagulante marinho (0,45 M de NaCl, 0,1 M de glicose, 30 mM de citrato trissódico, 26 mM de ácido cítrico (monoidratado), 10 mM de EDTA em 1 litro de água ultrapura) (SÖDERHÄLL; SMITH, 1983). Para cada técnica de coloração, foi utilizado 1 *pool* de cada sexo, e as lâminas foram preparadas em câmara úmida e citocentrífuga. A hemolinfa foi coletada dos organismos utilizando uma fina agulha de vidro, que foi inserida no primeiro ou no segundo segmento dorsal de *P. hawaiiensis*, e por capilaridade foi coletada (<https://www.youtube.com/watch?v=pEAzGeAR9cg>) (DOS SANTOS et al., 2022; VANNUCI-SILVA et al., 2018) (Figura 1).

Após estabelecer a técnica mais eficiente para coloração dos hemócitos de *P. hawaiiensis*, alguns métodos de preparação de lâminas foram testados. Sendo estes: (a) dois tipos de diluentes, o anticoagulante marinho e o paraformaldeído 4% em água do mar reconstituída e (b) a velocidade e o tempo de citocentrifugação.

**Figura 1.** Coleta de hemolinfa de *Parhyale hawaiiensis*.



Após a determinação da melhor técnica de coloração e preparo de lâmina, foram utilizados 40 anfípodes, sendo 20 machos e 20 fêmeas de 8 meses de idade. Para o preparo de cada lâmina, amostras de hemolinfa de dois anfípodes do mesmo sexo foram coletadas, conforme descrito anteriormente, e imediatamente transferidas para 100  $\mu$ L de paraformaldeído (4% p.a., Synth) em água do mar reconstituída. As lâminas foram preparadas em citocentrífuga (3400 Excelsa FLEX, Fanem) a 300 rpm por 3 min. Os hemócitos foram fixados antes do preparo das lâminas, pois nos testes preliminares sem fixação foi observado um número elevado de células espalhadas, dificultando a caracterização. Após a retirada das lâminas da citocentrífuga, foram fixadas novamente em paraformaldeído a 4% em água do mar reconstituída por 15 min e coradas com Rosenfeld (Dinâmica). Para coloração, as lâminas foram cobertas com 1 mL de Rosenfeld por 7 min, em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada por mais 7 min e, por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente.

As lâminas foram fotografadas em microscópio (AxioScope.A1, Carl Zeiss) com câmera acoplada (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss), utilizando o software Zen 2.3 Lite (Carl Zeiss) sob aumento de 1000x. Algumas fotos das lâminas, foram selecionadas aleatoriamente, para medir o diâmetro dos hemócitos, utilizando o software ImageJ (versão 1.52n, SCHINDELIN et al., 2012). Cem células de cada amostra foram classificadas de acordo com suas características identificáveis para calcular a porcentagem de cada tipo de célula. As porcentagens obtidas de cada lâmina para cada tipo de célula foram avaliadas quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). Quando os dados apresentaram distribuição normal e distribuição das variâncias homogênea, a porcentagem de cada tipo celular foi comparada entre machos e fêmeas utilizando o teste T para amostras independentes. Para dados com distribuição normal e distribuição de variâncias não homogêneas, foi utilizado o teste T com correção de Welch.

### **5.2.2. Caracterização dos hemócitos de *P. hawaiiensis* por citometria de fluxo**

A citometria de fluxo permite avaliar, simultaneamente, o tamanho e a granulosidade das células, e a partir desses parâmetros é possível realizar a identificação dos tipos celulares. Essa técnica demanda um número considerável de células e um ensaio preliminar foi realizado para verificar a viabilidade de utilizar a citometria de fluxo para amostras de hemolinfa de *P. hawaiiensis*. A hemolinfa foi coletada conforme descrito no item anterior de organismos com 8 meses de idade. Foram preparados *pool's* de hemolinfa de 2, 4 e 8 organismos, sendo machos e fêmeas, separadamente. As amostras foram preparadas em duplicata e em cada tubo havia o mesmo volume de anticoagulante marinho (220  $\mu$ L). As análises foram conduzidas em um

citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6 Plus, BD Biosciences), em cooperação com o Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As amostras foram coletadas pelo equipamento até a contagem de 10000 partículas (eventos) por análise, assim o volume de cada amostra utilizado variou conforme sua concentração de partículas. No software do equipamento (BD Accuri™ C6 Software, BD Biosciences) foram selecionados os *gates* para a contagem dos eventos e caracterização do tamanho e granulosidade celular. O *gate* é desenhado conforme algum conhecimento prévio da amostra, para diferenciar as partículas de interesse de possíveis *debris* ou outras partículas que podem estar presentes na amostra (VERSCHOOR et al., 2015). Neste estudo, o *gate* foi desenhado baseado nas contagens preliminares realizadas em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

### 5.2.3. Análise qualitativa da presença de lipídeos nos hemócitos

Amostras de hemolinfa de dois organismos foram coletadas e imediatamente transferidas para 100 µL de água do mar reconstituída. Esta suspensão de células foi espalhada em uma lâmina e colocada em uma câmara úmida por 1 hora, para o espriamento das células. Em seguida, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em água do mar reconstituída por 15 min. As lâminas foram imersas por 3 min em álcool 50° e em seguida coradas com Sudan Black B filtrado (Merck, [3 g L<sup>-1</sup>] em álcool 70°) por 10 min. Posteriormente, foram lavadas em álcool 50° e, por fim em água corrente.

### 5.2.4. Ensaio qualitativo de fagocitose

Ensaio qualitativo para verificar as respostas de fagocitose foram realizados expondo as células à bactéria gram-negativa, *Escherichia coli* (DH5α). Amostras de hemolinfa de dois organismos do mesmo sexo foram coletadas e imediatamente transferidas para 100 µL de água do mar reconstituída. Esta suspensão de células foi espalhada em uma lâmina e colocada em uma câmara úmida, para espriamento das células, durante 30 min. Em seguida, 100 µL de solução de *E. coli* foram adicionados à lâmina, que ficou por mais 30 min na câmara úmida para possível fagocitose. Após esse período, as lâminas foram lavadas delicadamente com água do mar reconstituída e fixadas em paraformaldeído a 4% em água do mar por 15 min. As lâminas foram coradas utilizando coloração de Gram. Lâminas sem adição de *E. coli* também foram preparadas em câmara úmida. As lâminas foram deixadas por 1 hora na câmara úmida e, em seguida, foram fixadas e coradas com Rosenfeld para avaliar os tipos de células que estavam espriando e mostrando potencial capacidade de fagocitar as bactérias.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

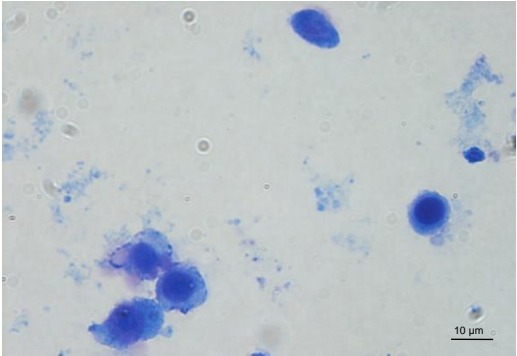
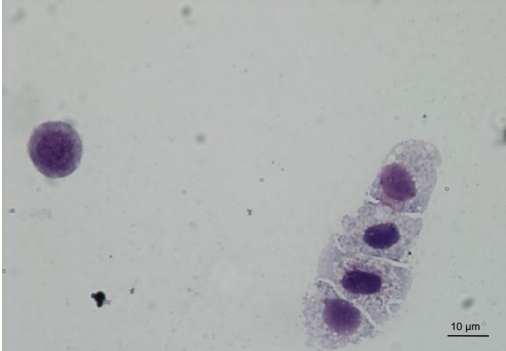
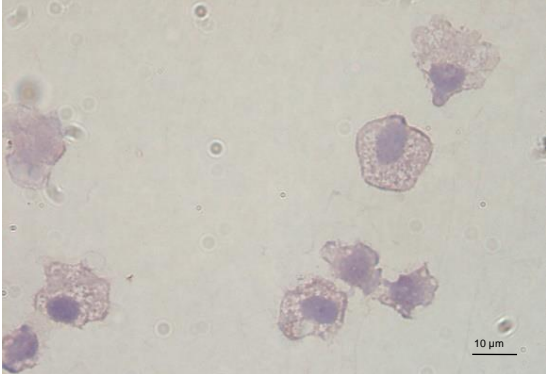
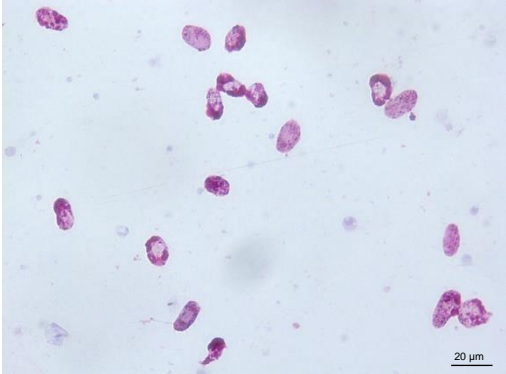
#### 5.3.1. Caracterização dos hemócitos de *P. hawaiiensis* em lâminas citológicas

Um resumo dos resultados obtidos nas diferentes técnicas de coloração pode ser observado da tabela 1. A coloração de Rosenfeld foi escolhida, pois corou os grânulos, permitindo a distinção entre hialinócitos, semi-granulócitos e granulócitos. A câmara úmida foi descartada como técnica de preparo de lâminas para avaliar os tipos de células, pois as células ficavam dispersas e dificultavam a identificação. No entanto, foi a melhor opção os para ensaios de fagocitose. Os métodos testados para preparo das lâminas são apresentados na tabela 2. O melhor diluente para preservar os hemócitos foi o paraformaldeído a 4% em água do mar, e testando a velocidade e a redução do tempo, verificamos que o melhor programa de citocentrífuga foi de 300 rpm por 3 min. Reduzir o tempo é importante para realizar experimentos maiores no futuro.

Seguindo o critério morfológico proposto por Bauchau (1981), que está relacionado à presença/ausência de grânulos refringentes, três tipos básicos de células foram identificados em *P. hawaiiensis*: hialinócitos, granulócitos e semi-granulócitos. Os resultados obtidos corroboram com outros estudos realizados em crustáceos (DEZFULI et al., 2008; JOHANSSON et al., 2000).

O diâmetro médio dos hemócitos foi de  $11,4 \pm 1,4 \mu\text{m}$  ( $n = 100$  células). Os hialinócitos não continham grânulos, e apresentaram uma pequena área de citoplasma e um núcleo grande e visível. Os semi-granulócitos apresentavam grânulos dispersos no citoplasma e um núcleo pequeno, mas visível. Os granulócitos apresentaram muitos grânulos distribuídos por toda a célula e cobrindo partes ou todo o núcleo. Um resumo das características dos hemócitos pode ser observado na tabela 3. Em machos ( $n = 1331$  células) e fêmeas ( $n = 941$  células), o tipo de célula mais abundante foi granulócito, com  $64,8 \pm 11,1\%$  e  $70,1 \pm 7,1\%$ , respectivamente, seguido por semi-granulócitos, com  $31,1 \pm 8,9\%$  e  $28,2 \pm 6,7\%$ , respectivamente, e hialinócitos, com  $4,2 \pm 3,9\%$  e  $1,7 \pm 0,9\%$ , respectivamente. As fêmeas apresentaram uma porcentagem significativamente menor de hialinócitos do que os machos, mas não houve diferença significativa entre os outros dois tipos (Figura 2).

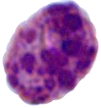
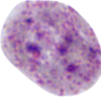

**Tabela 1.** Técnicas de coloração testadas para identificar os hemócitos do anfípode marinho *Parhyale hawaiiensis*.

| Técnicas de coloração              | Observações e fotos   | Técnicas de coloração       | Observações e fotos  |
|------------------------------------|---|-----------------------------|--|
| Romanowsky<br>(ou Panótico rápido) | <p>As células adquiriram cor, mas foi difícil diferenciar os núcleos dos hemócitos e o citoplasma.</p>   | May-<br>Grunwald-<br>Giemsa | <p>As células adquiriram coloração escura, não sendo possível diferenciar os núcleos de hemócitos e citoplasma em algumas células.</p>  |
| Hematoxilina<br>e Eosina           | <p>As células adquiriram coloração clara, não sendo possível diferenciar os grânulos de hemócitos.</p>  | Rosenfeld                   | <p>As células adquiriram cor e foi possível observar grânulos.</p>   |

**Tabela 2.** Métodos de preparação de lâminas testados para identificar os hemócitos do anfípode marinho *Parhyale hawaiensis*.

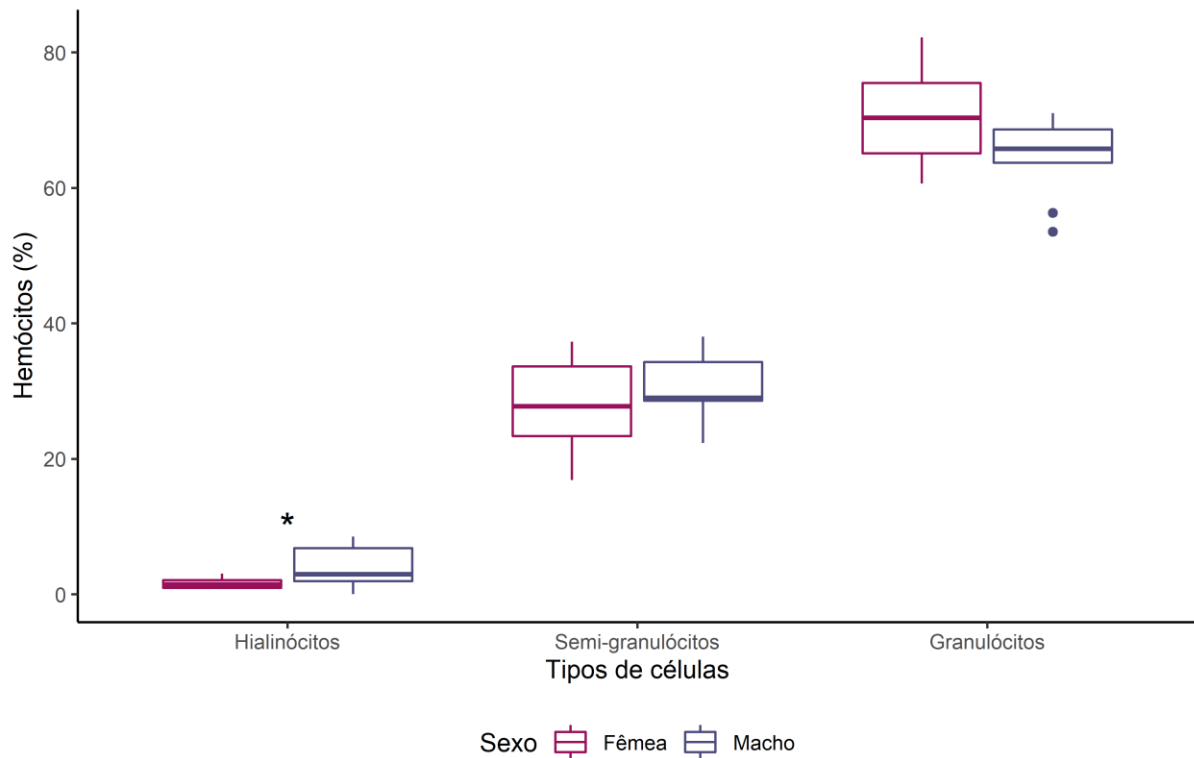
| Teste | Diluentes para hemolinfa            | Programa da citocentrífuga           | Observações   |
|-------|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1     | Anticoagulante marinho              | Velocidade: 800 rpm<br>Tempo: 10 min | As células estavam concentradas nas bordas do círculo e algumas células estavam com o conteúdo celular vazado. Observou-se um elevado número de células espariadas, dificultando a classificação do tipo celular. |
| 2     |                                     | Velocidade: 400 rpm<br>Tempo: 10 min |   |
| 3     | 4% paraformaldeído (em água do mar) | Velocidade: 400 rpm<br>Tempo: 5 min  | As células foram concentradas na lâmina sem aglomeração e sem deformações.  |
| 4     |                                     | Velocidade: 300 rpm<br>Tempo: 3 min  |   |

**Tabela 3.** Resumo da descrição e das principais características dos hemócitos de *Parhyale hawaiensis*.

| Tipo de hemócito  | Grânulos |                           | Citoplasma | Núcleo               | Técnica de coloração Rosenfeld |               |                         |
|---|----------|---------------------------|------------|----------------------|--------------------------------|---------------|-------------------------|
|   | Presente | Distribuição              |            |                      | Grânulos                       | Citoplasma    | Núcleo                  |
| Granulócitos  |          |                           |            |                      |                                |               |                         |
|  | Sim      | Muitos, por toda a célula | Abundante  | Coberto por grânulos | Roxo/<br>Rosa                  | Azul<br>claro | Roxo/<br>rosa<br>claros |
| Semi-granulócitos   |          |                           |            |                      |                                |               |                         |
|  | Sim      | Espalhados                | Abundante  | Visível              | Roxo/<br>Rosa                  | Azul<br>claro | Azul<br>claro           |
| Hialinócitos  |          |                           |            |                      |                                |               |                         |
|  | Não      | -                         | Escasso    | Visível              | -                              | Roxo          | Rosa<br>escuro          |



**Figura 2.** Porcentagem dos tipos de hemócitos observados em *Parhyale hawaiensis* para cada sexo.



\*Indica diferenças significativas entre machos e fêmeas.

O tipo de hemócito predominante parece variar de acordo com as diferentes espécies de crustáceos avaliados. Assim, como a proporção que foi encontrada para *P. hawaiensis*, o caranguejo *Eriocheir sinensis* apresentou maior número de granulócitos do que os outros tipos celulares (HONG et al., 2013). Os semi-granulócitos foram o tipo predominante em lagostas (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; JUSSILA et al., 1997), outras espécies de caranguejos (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; YILDIZ; ATAR, 2002), lagostins (DING et al., 2012), e camarão (SUN; WANG; ZHANG, 2010). Os hialinócitos foram o tipo predominante em algumas espécies de caranguejo (MATOZZO; MARIN, 2010a), camarão (GALLO; SCHIAVON; BALLARIN, 2011; HOSE; MARTIN, 1989; VÁZQUEZ et al., 1997), lagosta (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990), e lagostins (LANZ; TSUTSUMI; ARÉCHIGA, 1993). Esses achados indicam que não há um padrão claro das proporções relativas de cada tipo de hemócito em crustáceos, e acredita-se que possa ser influenciado pelo ciclo de muda, dieta, doenças, local de coleta dos organismos e contaminantes ambientais (MATOZZO; MARIN, 2010a).

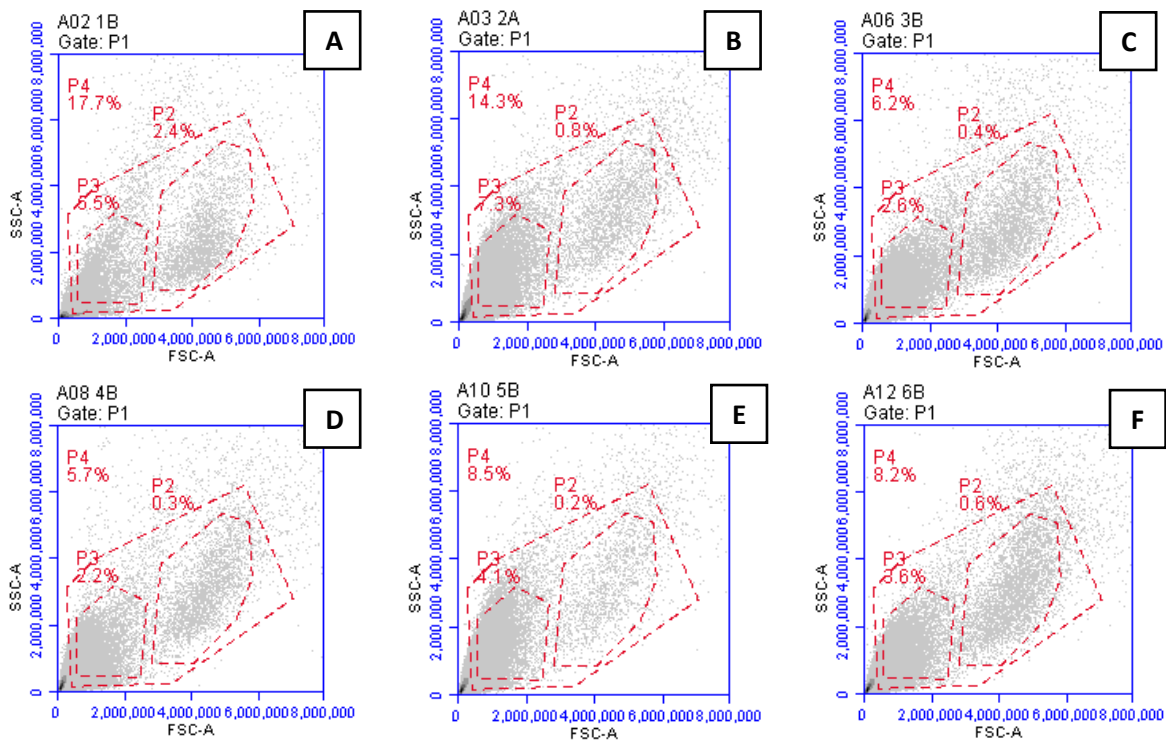
Ismail (2011) estudou os mecanismos de defesa celular em diferentes tecidos e órgãos de *P. hawaiensis* após infecção por dois parasitas, e identificou apenas granulócitos na hemolinfa

tanto sob microscopia de luz quanto eletrônica. Alterações significativas na proporção de tipos de hemócitos, sendo diminuição ou aumento de um ou mais tipos celulares, também foram relatadas em mexilhões expostos a poluentes (BOLOGNESI; FENECH, 2012), caranguejos estuarinos expostos a arsênio (SAHA; RAY; RAY, 2011), camarões de água doce injetados com variantes de vírus (SUNG; HWANG; TASI, 2000) e camarão injetado com *Micrococcus luteus* (GALLO; SCHIAVON; BALLARIN, 2011). Esses estudos apontam que as proporções do tipo de hemócitos podem ser um indicador rápido e de baixo custo do estado fisiológico do organismo.

### 5.3.2. Caracterização dos hemócitos de *P. hawaiiensis* por citometria de fluxo

Neste experimento inicial foi possível fazer a contagem das células de *P. hawaiiensis* utilizando o citômetro de fluxo. Porém, observou-se uma contagem muito alta de células, mais que 10000 eventos na maioria das amostras, número maior do que o esperado, baseado nas contagens realizadas manualmente no hemocitômetro. Desta forma, o método empregado não se mostrou adequado, mais estudos poderiam ser realizados para viabilizar o seu uso.

**Figura 3.** Gráficos obtidos da análise em citômetro de fluxo (contagem, tamanho e granulosidade)<sup>(a)</sup> das células da hemolinfa de *Parhyale hawaiiensis*<sup>(b)</sup>.

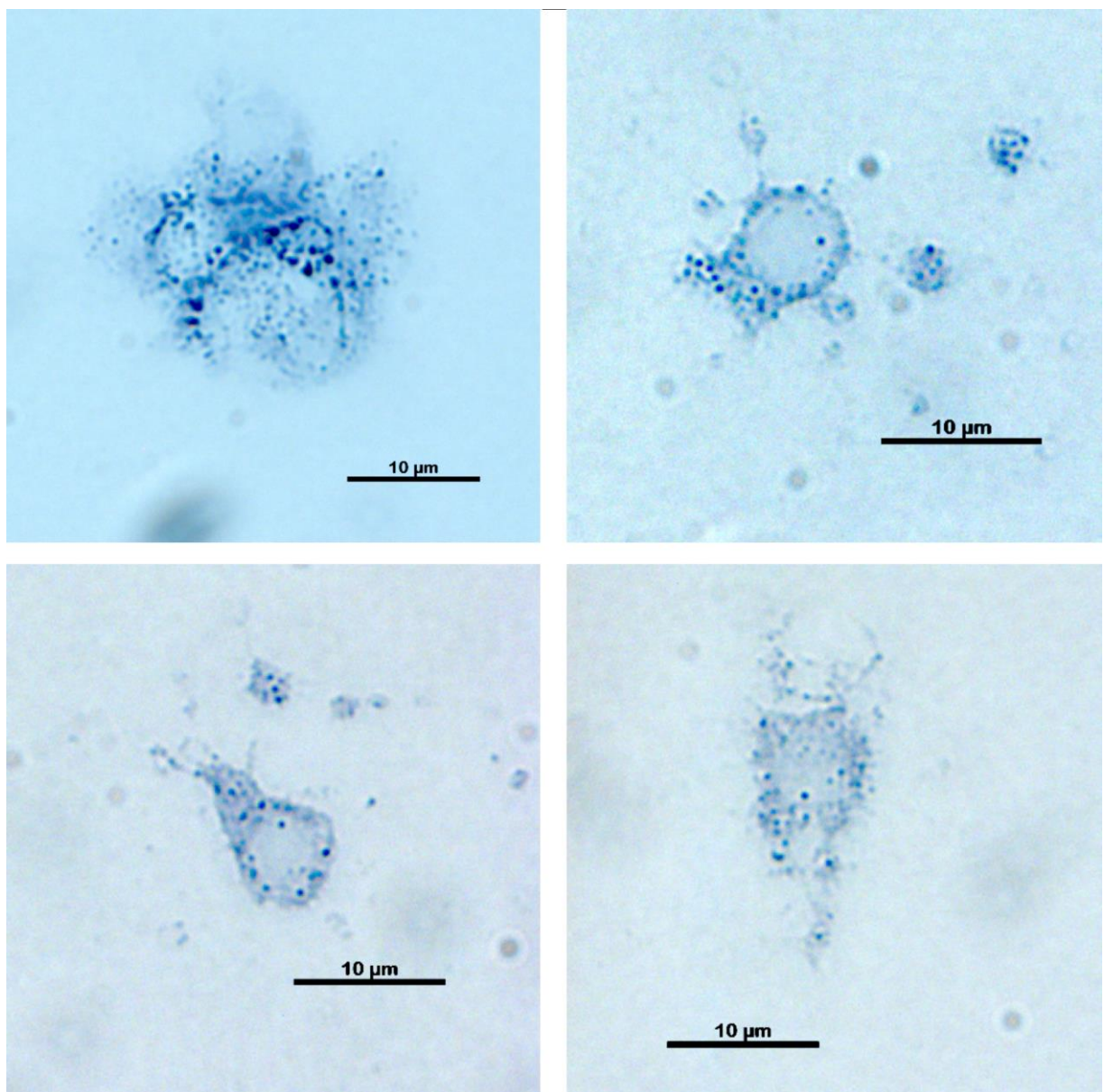


<sup>(a)</sup> FSC, *Forward Scatter*, ângulo de dispersão frontal, indica o tamanho relativo da célula; SSC, *Side Scatter*, ângulo de dispersão lateral, indica a granulosidade ou complexidade celular. <sup>(b)</sup> As imagens de A-C são de amostras de 2, 4 e 8 fêmeas, respectivamente e as imagens de E-F são de amostras de 2, 4 e 8 machos, respectivamente.

### 5.3.3. Análise qualitativa da presença de lipídeos nos hemócitos

Hemócitos de *P. hawaiiensis* foram positivos para coloração de Sudan Black B para lipídios. Foi observada reação positiva identificada por manchas pretas no citoplasma (Figura 4). Segundo Matozzo & Marin (2010a) todos os tipos de hemócitos do caranguejo *Carcinus aestuarii* foram positivos para Sudan Black B. Eles observaram deposições pretas na membrana celular tanto dos hialinócitos quanto das células contendo grânulos e no citoplasma dos granulócitos.

**Figura 4.** Hemócitos de *Parhyale hawaiiensis* corados com Sudan Black B.



#### 5.3.4. Ensaio qualitativo de fagocitose

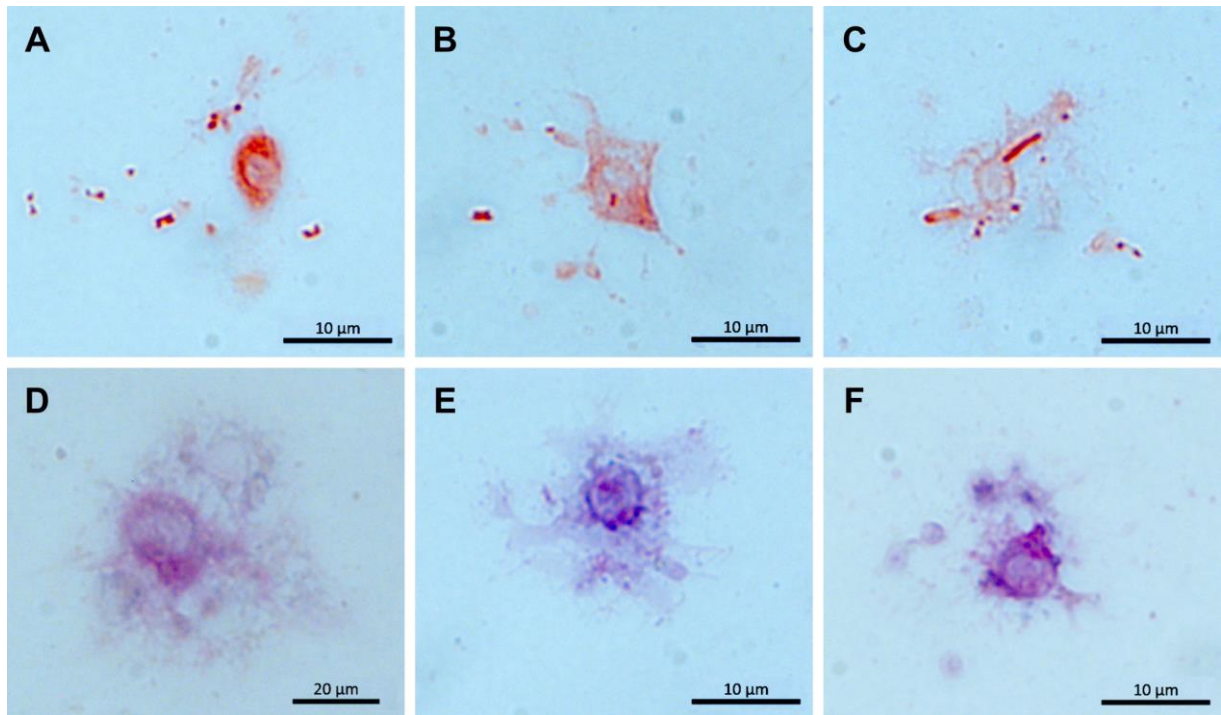
A fagocitose é comumente considerada um dos mecanismos imunes celulares mais importantes em crustáceos. Entre os três tipos de hemócitos, geralmente os hialinócitos e os semi-granulócitos são ativamente fagocitários (SODERHALL; SMITH; JOHANSSON, 1986). No entanto, resultados conflitantes quanto aos tipos de hemócitos que atuam na fagocitose são relatados na literatura. Semi-granulócitos e hialinócitos do camarão marinho *Squilla mantis* foram capazes de fagocitar leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (GALLO; SCHIAVON; BALLARIN, 2011). Em *Carcinus aestuarii*, apenas hialinócitos foram capazes de fagocitar células leveduriformes (*S. cerevisiae*) ou Zymosan (paredes celulares de leveduras) (MATOZZO; MARIN, 2010b). Granulócitos pequenos e grandes de *Macrobrachium rosenbergii*, *M. acanthurus* e *P. monodon* foram ativamente fagocitários quando incubados com a levedura *S. cerevisiae* (GARGIONI; BARRACCO, 1998). Em outro estudo, hemócitos granulares de *M. rosenbergii* também foram responsáveis pela atividade fagocítica de eritrócitos de galinha (VÁZQUEZ et al., 1997). Apenas granulócitos do camarão *Sicyonia ingentis* foram envolvidos na fagocitose *in vitro* de uma bactéria marinha (*Cytophaga sp.*) (HOSE; MARTIN, 1989). Lanz et al. (1993) mostraram que hemócitos granulares e semi-granulares participam da função fagocítica e citotóxica do lagostim *Procambarus clarki*.

Em *P. hawaiensis*, foi possível observar *E. coli* fagocitada dentro dos hemócitos (Figura. 5A–C). Ismail (2011) utilizando micrografias eletrônicas, observou que o processo de fagocitose em granulócitos de *P. hawaiensis* foi formado por invaginação da superfície celular, seguido de formação de pseudópodes engolfando o parasita a um vacúolo endocítico conhecido como fagossomos primários. Uma vez que o parasita estava dentro dos fagossomos, o material degradado apareceu como corpos residuais dentro dos fagossomos secundários que foram descarregados fora do granulócito. Utilizando suspensão celular espalhada em lâmina e corada com Rosenfeld, alguns grânulos puderam ser visualizados dentro de algumas células, porém não foi possível identificar os tipos de hemócitos (Figura 5D-F). Assim, mais estudos são necessários, preferencialmente utilizando técnicas mais robustas, como microscopia eletrônica ou de transmissão.

Os dados obtidos no presente estudo, acrescentam novos conhecimentos sobre os hemócitos da hemolinfa de *P. hawaiensis*. Foi possível estabelecer os diferentes tipos de hemócitos e suas proporções em machos e fêmeas. Também foi possível observar que as células foram capazes de responder e fagocitar a bactéria *E. coli*. Como os hemócitos desempenham um papel importante no sistema imunológico dos organismos, o estudo das funções imunológicas dos

hemócitos da hemolinfa pode ser usado como um *endpoint* em ecotoxicologia usando *P. hawaiiensis* como organismo-teste.

**Figura 5.** Hemócitos espreiados de *Parhyale hawaiiensis* observados ao microscópio. (A-C). *Escherichia coli* (pontos laranja escuros) fagocitadas pelas células. (D-F). Hemócitos espreiados corados com Rosenfeld.



#### 5.4. CONCLUSÃO

Lâmina citológica foi a melhor técnica para caracterização das células da hemolinfa de *Parhyale hawaiiensis*. Três tipos celulares foram identificados na hemolinfa de *P. hawaiiensis*, classificados como granulócitos, semi-granulócitos e hialinócitos. O tipo mais abundante foi o granulócito, seguido de semi-granulócitos e um menor número de hialinócitos. As fêmeas apresentaram uma porcentagem significativamente menor de hialinócitos do que os machos, mas não houve diferença significativa entre os outros tipos. Hemócitos de *P. hawaiiensis* foram positivos à coloração lipídica e observou-se que a bactéria *E. coli* foi fagocitada pelos hemócitos. O presente estudo pode ser utilizado para melhor compreensão das funções imunológicas desses hemócitos, além de fornecer a base para o desenvolvimento de *endpoints* em estudos ecotoxicológicos utilizando este organismo-teste.



## 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B. S. et al. A Comparison of In Situ and Laboratory Toxicity Tests with the Estuarine Amphipod *Eohaustorius estuarius*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 52–60, jan. 2004.
- ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 15 mar. 2018.
- ARTAL, M. C. et al. Toxicity responses for marine invertebrate species of brazilian occurrence. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 14, n. 1, p. 15–25, 27 ago. 2019.
- ARTAL, M. C. et al. Transcriptome analysis in *Parhyale hawaiiensis* reveal sex-specific responses to AgNP and AgCl exposure. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113963, maio 2020.
- BATTISTELLA, S.; BONIVENTO, P.; AMIRANTE, G. A. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. **Italian Journal of Zoology**, v. 63, n. 4, p. 337–343, jan. 1996.
- BAUCHAU, A. G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. (Eds.). **Invertebrate blood cells - vol. 2**. New York/London: Academic Press, 1981. p. 385–420.
- BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1125–1137, 17 jun. 2012.
- BOTELHO, M. T. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles on a tropical marine amphipod via feeding exposure. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 881, n. July, p. 503527, set. 2022.
- BROUSSEAU, P.; FOURNIER, M. Aquatic Immunotoxicity. In: **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 79–88.
- DEZFULI, B. S. et al. Crustacean-acanthocephalan interaction and host cell-mediated immunity: parasite encapsulation and melanization. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 53–59, 1 mar. 2008.
- DING, Z. et al. Classification of circulating hemocytes from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* and their susceptibility to the novel pathogen *Spiroplasma eriocheiris* in vitro. **Aquaculture**, v. 356–357, p. 371–380, ago. 2012.
- DOS SANTOS, A. et al. Measuring concentrations of a dye in the hemolymph of a marine amphipod: Development of a protocol for exposure assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, n. October 2021, p. 113376, fev. 2022.
- GALLO, C.; SCHIAVON, F.; BALLARIN, L. Insight on cellular and humoral components of innate immunity in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 3, p. 423–431, set. 2011.
- GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H. Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. **Ecotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 5–23, 2001.
- GARGIONI, R.; BARRACCO, M. A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, n. 3, p. 209–221, jun. 1998.
- HONG, Y. et al. Effects of pH, temperature, and osmolarity on the morphology and survival rate of primary hemocyte cultures from the Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 49, n. 9, p. 716–727, 17 out. 2013.
- HOSE, J. E.; MARTIN, G. G. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia*

- ingentis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, n. 3, p. 335–346, maio 1989.
- HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. **The Biological Bulletin**, v. 178, n. 1, p. 33–45, fev. 1990.
- INGERSOLL, C. G. et al. Toxicity Assessment of Sediments from the Grand Calumet River and Indiana Harbor Canal in Northwestern Indiana, USA. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 156–167, 17 ago. 2002.
- ISMAIL, T. G. E. K. Coexistence of two species of haplosporidian parasites in a population of the marine amphipod *Parhyale hawaiiensis* with evidence for parasite phagocytosis and transmission mode. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 227–241, 2011.
- JOHANSSON, M. W. et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v. 191, n. 1–3, p. 45–52, nov. 2000.
- JUSSILA, J. et al. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress. **Marine and Freshwater Research**, v. 48, p. 863–867, 1997.
- LACAZE, E. et al. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, n. 1–2, p. 32–38, jul. 2010.
- LANZ, H.; TSUTSUMI, V.; ARÉCHIGA, H. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 17, n. 5, p. 389–397, set. 1993.
- MATOZZO, V.; MARIN, M. G. First cytochemical study of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). **European Journal of Histochemistry**, v. 54, n. 1, p. 9, 1 mar. 2010a.
- MATOZZO, V.; MARIN, M. G. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 534–541, abr. 2010b.
- PARIS, M. et al. **Chapter Eight - The crustacean model *Parhyale hawaiiensis***. In: BOB, G.; SRIVASTAVA, M. (Eds.). *Emerging Model Systems in Developmental Biology*. [s.l.] Current Topics in Developmental Biology, v. 147, 2022. p. 199–230.
- REHM, E. J. et al. Fixation and dissection of *Parhyale hawaiiensis* embryos. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 1, 2009.
- RONCI, L. et al. Evaluation of Genotoxic Potential of Waters from Two Italian Rivers in *Gammarus elvirae* (Amphipoda). **Water Environment Research**, v. 87, n. 11, p. 2008–2017, 1 nov. 2015.
- SAHA, S.; RAY, M.; RAY, S. Effect of sublethal concentration of arsenic on hemocyte density in edible crab, *Scylla serrata*. **Animal Science and Issues**, n. January, p. 27–36, 2011.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.
- SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 229–239, mar. 1983.
- SODERHALL, K.; SMITH, V.; JOHANSSON, M. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. **Cell and Tissue Research**, v. 245, n. 1, jul. 1986.



- SUN, J.; WANG, A.; ZHANG, T. Flow Cytometric Analysis of Defense Functions of Hemocytes from the Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 1, p. 92–105, fev. 2010.
- SUNG, H.-H.; HWANG, S.-F.; TASI, F.-M. Responses of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to Challenge by Two Strains of *Aeromonas spp.* **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, n. 4, p. 278–284, nov. 2000.
- VACCHI, F. I. et al. *Parhyale hawaiiensis* as a promising alternative organism for monitoring acute toxicity of sediments under the influence of submarine outfalls. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, n. April, p. 110658, dez. 2019.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. Higher silver bioavailability after nanoparticle dietary exposure in marine amphipods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 806–810, 19 abr. 2019.
- VÁZQUEZ, L. et al. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Morphology**, v. 234, n. 2, p. 147–153, nov. 1997.
- VERSCHOOR, C. P. et al. An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUL, p. 1–9, 27 jul. 2015.
- WANG, X.; ZAUKE, G.-P. Size-dependent bioaccumulation of metals in the amphipod *Gammarus zaddachi* (Sexton 1912) from the River Hunte (Germany) and its relationship to the permeable body surface area. **Hydrobiologia**, v. 515, n. 1–3, p. 11–28, mar. 2004.
- WEBER, L. et al. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod *Quadrivisio aff. lutzii* (Gammaridea) as assessed using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 4, p. 642–655, 13 maio 2013.
- YILDIZ, H. Y.; ATAR, H. H. A. Haemocyte Classification and Differential Counts in the Freshwater Crab, *Potamon fluviatilis*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 403–406, 2002.

# Capítulo 3



*Neste capítulo foram apresentados os resultados obtidos no estágio da aluna no exterior, referente as técnicas aprendidas para subsidiar o desenvolvimento do seu projeto de doutorado.*

*No período de janeiro a agosto de 2018, a aluna desenvolveu o projeto intitulado “Method development on the identification and quantification of microplastics in water samples and immuno-toxicological effects of microplastics on amphipods”, com uma bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE) concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo número: 208418/2017-2). O projeto foi desenvolvido na Heriot-Watt University (Escócia, Reino Unido), sob supervisão do Prof. Dr. Theodore B. Henry e co-orientação da profa. Dra. Elisabeth Dyrinda e da pesquisadora Dra. Ana Catarino.*

## 6.1. INTRODUÇÃO

A crescente poluição dos ambientes marinhos por detritos plásticos tornou-se uma preocupação ambiental. Pequenos pedaços de plástico entre 1 e 5 mm, denominados microplásticos, são os detritos plásticos mais numerosos que foram detectados em ambientes marinhos, e podem se acumular na superfície do mar, nas costas, em sedimentos e dentro de organismos (ANDRADY, 2011; SONG et al., 2014; VAN CAUWENBERGHE et al., 2013). Os microplásticos são divididos em grânulos plásticos, partículas, fragmentos e fibras, e podem ser manufaturados em tamanho microscópico ou derivados da fragmentação de detritos plásticos maiores após degradação prolongada (COLE et al., 2015). O estudo sobre os microplásticos é considerado um campo em evolução (THOMPSON, 2004), e ainda não há consenso sobre metodologias padronizadas para a extração, quantificação, caracterização e toxicidade deste poluente (ROCHMAN; REGAN; THOMPSON, 2017).

Duas técnicas principais têm sido utilizadas na identificação e quantificação de microplásticos, a espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FT-IR) ou a espectroscopia de Raman equipada com um microscópio (SONG et al., 2014; VAN CAUWENBERGHE et al., 2013). No entanto, essas duas técnicas requerem instrumentos caros e o processamento de amostras é muito demorado. Portanto, estudos para desenvolver métodos alternativos para facilitar a identificação de microplásticos para monitoramento em campo e estudos laboratoriais sobre a toxicidade, acúmulo, intemperismo etc. de microplásticos são de grande importância (SHIM et al., 2016). Recentemente, um método alternativo para quantificação e identificação de microplásticos tem sido estudado. Este método baseia-se na coloração dos microplásticos com um corante fluorescente, chamado de *Nile Red*, e posterior medição da fluorescência usando um software de imagem. Essa técnica é economicamente viável, mas ainda não padronizada, pois diferentes filtros e luzes de microscópio foram aplicados, bem como diferentes comprimentos de onda de emissão e excitação para visualizar e medir a fluorescência das fibras (COLE, 2016; ERNI-CASSOLA et al., 2017; MAES et al., 2017; SHIM et al., 2016; TAMMINGA, 2017).

Além de identificar e quantificar os microplásticos em ambientes aquáticos, é importante conhecer os efeitos dos microplásticos nos organismos aquáticos. Alguns estudos foram realizados e vários efeitos adversos já foram identificados, como: redução da alimentação, tamanho dos ovos e sucesso de eclosão em copépodos marinhos (COLE et al., 2013, 2015); redução das reservas de alimentação e energia, e comprometimento do processo de escavação de uma minhoca marinha (WRIGHT et al., 2013); redução do número de ovos, tamanho do ovo

e motilidade espermática de ostras, e diminuição do desenvolvimento larval da prole (SUSSARELLU et al., 2016); retardo da metamorfose de ascídias e alteração do desenvolvimento pós-embrionário e/ou crescimento de ouriços (MESSINETTI et al., 2018); além de poder atuar como vetor para a assimilação de poluentes orgânicos persistentes (POP's) em anfípodes marinhos (CHUA et al., 2014).

Nesse contexto, estudar *endpoints* mais sensíveis é a melhor maneira de entender os efeitos dos microplásticos na biota aquática. Os microplásticos têm a capacidade de induzir respostas imunológicas, porém essas respostas têm sido amplamente estudadas do ponto de vista terapêutico, e pouco se sabe sobre a toxicidade dessas partículas (WRIGHT, 2015). Para entender melhor os efeitos desses contaminantes, o uso de organismos representativos é de grande relevância. Os anfípodes são pequenos organismos encontrados em ambientes aquáticos, sendo a maioria encontrados em ambientes marinhos (RUPPERT; BARNES, 1996), são importantes fontes de energia na cadeia alimentar, servindo de presa para crustáceos e peixes maiores (MELO; NIPPER, 2007). Esses organismos têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade devido à sua relevância ecológica, sensibilidade a distúrbios ambientais e por serem abundantes, amplamente distribuídos e facilmente cultivados em laboratório (KING et al., 2006; NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002).

Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um método para identificação de fibras, utilizando o corante *Nile Red* e um software de tratamento de imagens de domínio público, antes e depois do processo de digestão. E verificar os efeitos de microplásticos no sistema imune de um anfípode marinho.

## 6.2. METODOLOGIA

### 6.2.1. Desenvolvimento do método para identificação de hemócitos de anfípodes

#### *Coleta e identificação dos anfípodes*

Os anfípodes foram coletados entre o sedimento e mexilhões na praia de Musselburgh (55°56'43.3"N, 3°04'09.9"O), Reino Unido, no período de maré baixa. No laboratório, os organismos foram separados por tamanho e colocados em água do mar limpa para aclimatação. A espécie foi identificada seguindo as chaves de subordem, família e espécie (HAYWARD; RYLAND, 1990), utilizando um microscópio de dissecação (MZ8, Leica) para observação. Para confirmar o nome e características da espécie, foi utilizado o banco de dados do *Marine Species Identification Portal*. A espécie identificada foi *Echinogammarus marinus* (LEACH, 1815) (Figura 1).

**Figura 1.** Adultos de *Echinogammarus marinus*.



#### *Diluentes para hemolinfa*

Duas soluções foram testadas no desenvolvimento do método. Um deles foi o anticoagulante marinho - MAC (0,45M NaCl, 0,1M Glicose, 30mM Citrato de sódio, 26mM ácido cítrico (monoidratado), 10mM EDTA em 1L de água ultrapura), comumente utilizado

para a extração de células vivas da hemolinfa de crustáceos (SÖDERHÄLL; SMITH, 1983). A outra solução foi preservar as células imediatamente após a extração em formol a 4% em água do mar filtrada.

#### *Coleta de hemolinfa dos anfípodes*

Primeiro, os anfípodes foram lavados com água ultrapura, posteriormente foram imobilizados com auxílio de uma pinça e colocados com os segmentos dorsais para cima. Uma agulha fina de vidro foi inserida no primeiro ou segundo segmento dorsal e a hemolinfa foi extraída (DOS SANTOS et al., 2022; VANNUCI-SILVA et al., 2018) (Figura 1, Capítulo 2). O volume de hemolinfa recolhida foi colocado num tubo Eppendorf de 2 mL contendo 120 µL de diluente.

#### *Contagem total de células*

A contagem total de células foi realizada utilizando um hemocitômetro (câmara de Neubauer) com 10 µL de amostra. O microscópio de luz (BX50F, Olympus) foi usado para contar as células.

#### *Contagem diferencial das células*

A coloração celular é necessária para a diferenciação dos tipos de células. As amostras de hemolinfa com diluente (100 µL) foram centrifugadas em uma citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon) para concentrar as células nas lâminas. Vários programas foram testados para encontrar o melhor método para amostras de hemócitos dos anfípodes. Os hemócitos foram fixados/permeabilizados com metanol durante 1 min, depois corados com Diff-Quik™ (Gamidor) vermelho durante 1,5 min, em seguida com o azul por mais 1 min e por fim, enxaguados, cuidadosamente, com água de torneira. Após a secagem, as lâminas foram montadas com meio de montagem e lamínula. As lâminas foram armazenadas e, posteriormente, as fotos foram tiradas com auxílio de um microscópio (Axio Scope.A1, Carl Zeiss), com câmera acoplada (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss) e o software Zen 2.3 Lite (Carl Zeiss).

### **6.2.2. Aplicação do método para identificação de hemócitos**

Para a aplicação do método um experimento foi realizado com partículas de poliestireno. A exposição foi realizada através de alimentos contaminados com 3 tamanhos diferentes de

partículas de poliestireno (20 nm, 250 nm e 1000 nm). Além da resposta imune, a respiração dos organismos também foi observada.

#### *Preparo do alimento com partículas de poliestireno*

O alimento base utilizado foi uma ração para alimentação de trutas (Nutra Parr 1,8 mm, Skretting). Anteriormente ao experimento, o alimento foi fornecido ao anfípodes para verificar sua aceitação. As partículas de poliestireno foram produzidas por Al-Sid-Cheikh et al. (2020) e antes do uso foram purificados por diálise em água ultrapura por 24 horas. Os alimentos foram preparados com 3 tamanhos de partícula (20 nm, 250 nm e 1000 nm) na concentração de 5% (peso seco). O alimento foi preparado misturando as partículas com comida de truta e água ultrapura na proporção de 1:1 (m:v). Depois de homogeneizar, o alimento foi cortado em pequenos pedaços usando uma malha. O alimento foi colocado em incubadora (IH-100, Gallenkamp) à 60°C para secagem, durante toda a noite. O alimento utilizado como controle positivo foi preparada da mesma forma, utilizando a bactéria marinha Gram-negativa *Listonella anguillarum*, que é patogênica para uma variedade de peixes, crustáceos e bivalves (HICKEY; LEE, 2018). Antes da preparação do alimento, as bactérias foram mantidas em banho fervente por 20 min, e sua morte foi verificada através da contagem de placas em ágar trípico de soja (TSA, Oxoid) suplementado com 1% de NaCl. A concentração de bactérias utilizada foi de  $6,7 \times 10^7$  bactéria  $g^{-1}$ . O alimento utilizado como controle negativo não sofreu nenhuma modificação da composição original.

#### *Condição de exposição*

O experimento foi realizado em triplicata, com 20 anfípodes adultos em cada réplica contendo 500 mL de água do mar, coral triturado como substrato e aeração constante. As condições abióticas do experimento foram  $15 \pm 2^\circ C$  e 12:12 horas de fotoperíodo. Troca parcial de água e medida dos parâmetros físico-químicos (salinidade  $34 \pm 2$ , pH  $8 \pm 1$  e oxigênio dissolvido  $8 \pm 2$  mg  $L^{-1}$ ) foram realizadas a cada dois dias. A alimentação foi realizada diariamente com 0,012 g de alimento por réplica, a quantidade de alimento foi calculada com base em Artal et al. (2018). O tempo de exposição foi de 14 dias.

#### *Ensaio de Respirometria*

O ensaio respirométrico em sistema fechado é uma ferramenta utilizada para avaliar as alterações metabólicas nos organismos expostos aos diferentes tipos substâncias. Ao final do experimento, os organismos sobreviventes de cada réplica foram colocados em potes plásticos

com barras magnéticas e mantidos sob agitação em um agitador magnético (MIX 15 eco, 2mag). O consumo de oxigênio foi medido utilizando um oxímetro com sensor infravermelho (Fibox 4, PreSens). As leituras foram realizadas em triplicata a cada 10 minutos durante 1 hora. A respirometria de sistema fechado é, basicamente, deixar os organismos em uma câmara fechada (selada) e medir o declínio na concentração de oxigênio na câmara ao longo do tempo, podendo assim inferir mudanças nas taxas metabólicas do organismo (SVENDSEN; BUSHNELL; STEFFENSEN, 2016).

#### *Contagem total e diferencial das células*

A contagem total e diferencial das células foi realizada da mesma forma descrita no item 5.2.1 deste capítulo. Na contagem diferencial das células, as amostras foram centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos em alta aceleração.

#### *Análise estatística*

A diferença entre os tratamentos e controles no ensaio de respirometria e contagem total de células foram calculadas utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) ( $p \leq 0,05$ ). Na contagem diferencial de células a diferença foi calculada utilizando análise de variância bidirecional ( $p \leq 0,05$ ), seguida do teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software OriginPro 2018b (Origin) e os gráficos foram construídos no software Excel 2016 MSO (Microsoft).

### **6.2.3. Quantificação de microplásticos em amostras de água do mar**

#### *Amostragem*

As amostras foram coletadas na Estação Marinha de St Abbs (55°53'54.9"N, 2°07'49.9"O), Reino Unido (Figura 2). A estação tem um acordo de colaboração com a Heriot-Watt University e com a Edinburgh Napier University, membros da Marine Alliance for Science and Technology for Scotland (MASTS). Primeiramente, foi realizada a medida do fluxo de água do encanamento para determinar a vazão. Para isso, um galão foi preenchido com água até um volume conhecido e o tempo foi registrado. Depois, as amostras de água foram coletadas, através de uma rede de plâncton (250  $\mu\text{m}$ ) durante 15 minutos, para cada amostra. Em seguida, a amostra que ficou retida à rede foi transferida para um frasco de coleta com auxílio de uma pisseta com água deionizada (Figura 3). Duas campanhas foram realizadas (janeiro e junho).



### *Digestão das amostras*

Para remoção da matéria orgânica das amostras, realizou-se o processo de digestão. Primeiramente, as amostras de água do mar foram filtradas usando filtração a vácuo com membrana de nitrato de celulose (47 mm de diâmetro e malha de 1  $\mu\text{m}$ , Whatman). As membranas foram lavadas com peróxido de hidrogênio 30% (Fisher Scientific) dentro de um frasco de vidro e completou-se o volume para 40 mL. Os frascos com as amostras foram colocados em agitação e aquecimento (60°C) utilizando um agitador magnético (RT 10 power, IKA) durante 24 e 48 horas. Posteriormente, as amostras digeridas foram filtradas a vácuo, com a mesma membrana citada acima. As membranas foram armazenadas em placa de Petri até a contagem e medição das fibras. Água ultrapura foi utilizada como controle.

**Figura 2.** Local de amostragem, Estação Marinha de St Abbs na Vila St Abbs, na costa sudeste da Escócia (Fonte: Google Maps).



### *Contagem e medição das fibras*

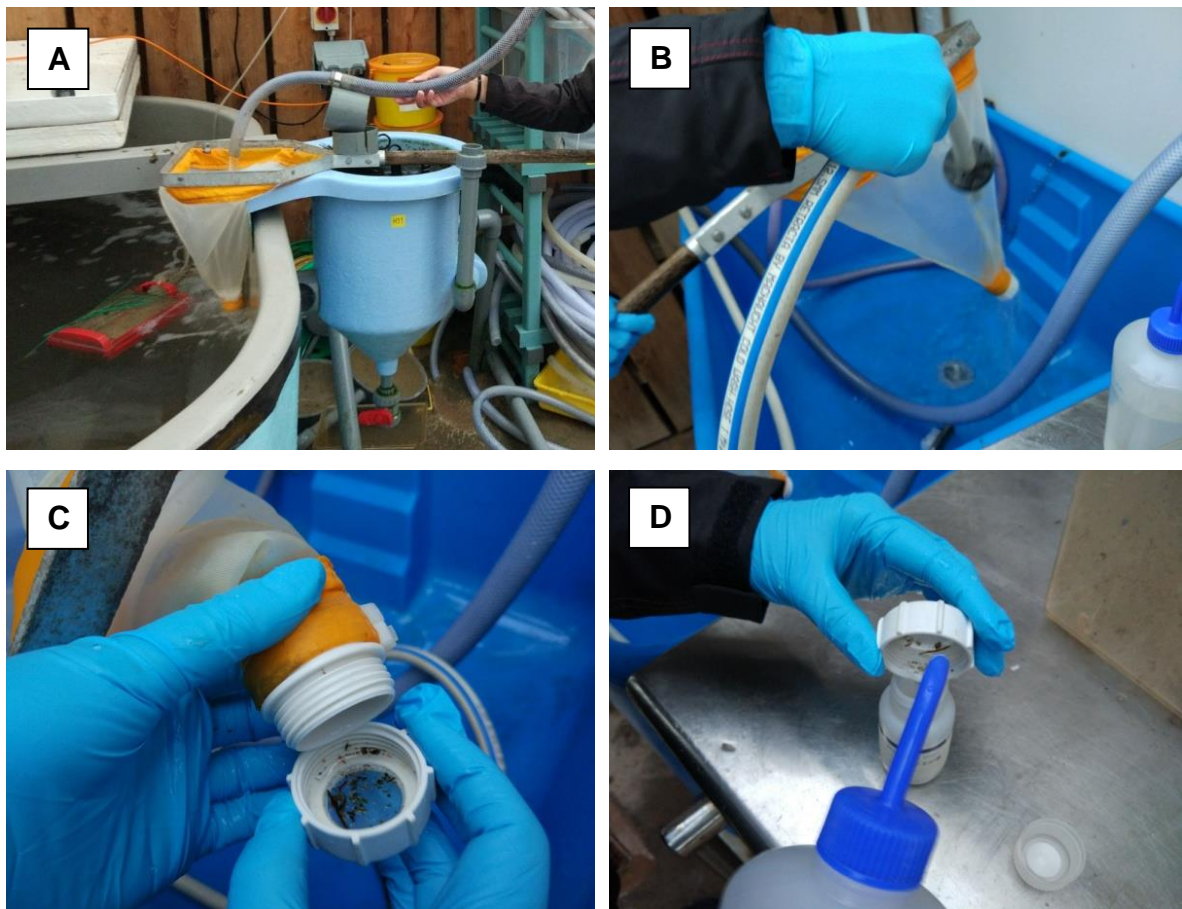
As membranas foram observadas e fotografadas utilizando um estereomicroscópio (MZ8, Leica) com câmera acoplada (AxioCam Color, Carl Zeiss). Para captura das imagens foi utilizado o software ZEN 2012 (Carl Zeiss). Posteriormente, as fotos foram analisadas utilizando o software ImageJ (versão 1.52d, SCHINDELIN et al., 2012).

### *Recuperação da digestão*

A taxa de recuperação do método foi avaliada utilizando alguns tipos conhecidos de fibras, coletadas de tecidos e cordas (padrões). Foram separadas 5 fibras de cada padrão usando um microscópio de dissecação. As fibras foram transferidas para blocos de coloração (40x40 mm)

e foram adicionados 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Fisher Scientific). Os blocos de coloração foram aquecidos a 60°C utilizando um agitador magnético (RT 10 power, IKA) durante 24 horas. Depois, com auxílio de microscópio de dissecação, as fibras foram contadas. As taxas de recuperação foram calculadas utilizando o número de fibras contadas após a digestão dividido pelo número de fibras adicionadas antes da digestão e expressas em porcentagem (número de fibras encontradas/número de fibras adicionadas x 100%).

**Figura 3.** Amostragem de água do mar e microplásticos na Estação Marinha de St Abbs.



(A) Passagem da água do mar pela rede de plâncton (250 µm) por 15 min, (B) Lavagem da rede, para concentrar as partículas na parte inferior da rede (tampa), (C) Abertura cuidadosa da tampa, (D) Transferência da amostra coletada para um frasco com auxílio de uma pisseta com água deionizada.

#### *Método para identificação das fibras (padrão)*

Após a digestão, as fibras padrão foram contadas e transferidas para lâminas, onde foram coradas com *Nile Red* (Sigma-Aldrich) em metanol na concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Lâminas com fibras sem o processo de digestão também foram preparadas e coradas com *Nile Red*. As fibras foram observadas e fotografadas utilizando um microscópio estereoscópico de fluorescência (M205 FCA, Leica) com câmera acoplada (DFC7000T, Leica) e LAS X Software (Leica).

*Análise estatística*

Para verificar se houve diferença entre o número de fibras encontrado nas amostras utilizando diferentes tempos de digestão utilizou-se análise de variância unidirecional (ANOVA) ( $p \leq 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software OriginPro 2018b (Origin) e os gráficos foram construídos no software Excel 2016 MSO (Microsoft).

### 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.3.1. Desenvolvimento do método para identificação de hemócitos de anfípodes

##### *Diluyente e programa da citocentrífuga*

Para identificar os hemócitos do anfípode marinho *Echinogammarus marinus* foram analisados três parâmetros: o número de organismos a serem utilizados para amostragem, o melhor diluyente e a programação da centrífuga. O primeiro parâmetro, número de organismos, foi avaliado, pois é importante a utilização de poucos organismos para o planejamento experimental dos testes subsequentes. A primeira tentativa foi coletar hemolinfa e observar hemócitos de dois organismos. Foi possível observar as células, porém em números insuficientes. Na segunda tentativa, um *pool* de hemolinfa de 10 organismos foi analisado e o número de células observadas foi satisfatório (Tabela 1).

O segundo parâmetro avaliado foi o diluyente, experimentou-se o anticoagulante marinho (MAC), que é geralmente utilizado em amostras de hemolinfa de caranguejo (ROBB et al., 2014; SÖDERHÄLL; SMITH, 1983) e formaldeído a 4%. É importante usar um anticoagulante eficiente que não danifique as características das células, para posterior observação e caracterização. De acordo com a tabela 1, o melhor diluyente para as amostras de *E. marinus* foi o anticoagulante marinho.

Por fim, foi avaliado a programação da centrífuga (velocidade, tempo e aceleração), este parâmetro é importante, pois neste processo pode ocorrer ruptura ou algum dano às células. O programa escolhido foi velocidade de 500 rpm, 3 minutos em alta aceleração. Em resumo, os melhores resultados obtidos para observação e caracterização de hemócitos de *E. marinus* foram obtidos no experimento 4, conforme pode ser observado na tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros avaliados para identificar os hemócitos do anfípode marinho *Echinogammarus marinus*.

| Teste | Número de organismos | Diluentes                       | Volume de amostra | Programa da citocentrífuga                                | Observações  |
|-------|----------------------|---------------------------------|-------------------|---|--|
| 1     | 2                    | MAC <sup>(a)</sup>              | 100 µL            | Velocidade: 500 rpm<br>Tempo: 3 min<br>Aceleração: Alta   | Foi possível visualizar os diferentes tipos de células, porém em pouco número.   |
| 2     | 10                   | MAC <sup>(a)</sup>              | 100 µL            | Velocidade: 250 rpm<br>Tempo: 3 min<br>Aceleração: Baixa  | Não foi possível visualizar as células.  |
| 3     | 10                   | Formaldeído<br>4% (água do mar) | 100 µL            | Velocidade: 1000 rpm<br>Tempo: 5 min<br>Aceleração: Baixa | A coloração das células ficou escura, dificultando a visualização. Algumas células ficaram agrupadas e algumas desfragmentadas.    |
| 4     | 10                   | MAC <sup>(a)</sup>              | 100 µL            | Velocidade: 500 rpm<br>Tempo: 3 min<br>Aceleração: Alta   | Foi possível visualizar os diferentes tipos de células e em grande número.   |
| 5     | 10                   | MAC <sup>(a)</sup>              | 100 µL            | Velocidade: 500 rpm<br>Tempo: 3 min<br>Aceleração: Baixa  | Foi possível visualizar os diferentes tipos de células, porém em pouco número.   |
| 6     | 10                   | Formaldeído<br>4% (água do mar) | 100 µL            | Velocidade: 500 rpm<br>Tempo: 3 min<br>Aceleração: High   | Adequado número de células, mas a coloração das células ficou escura, dificultando a visualização dos diferentes tipos de células. |

<sup>(a)</sup> MAC, anticoagulante marinho.

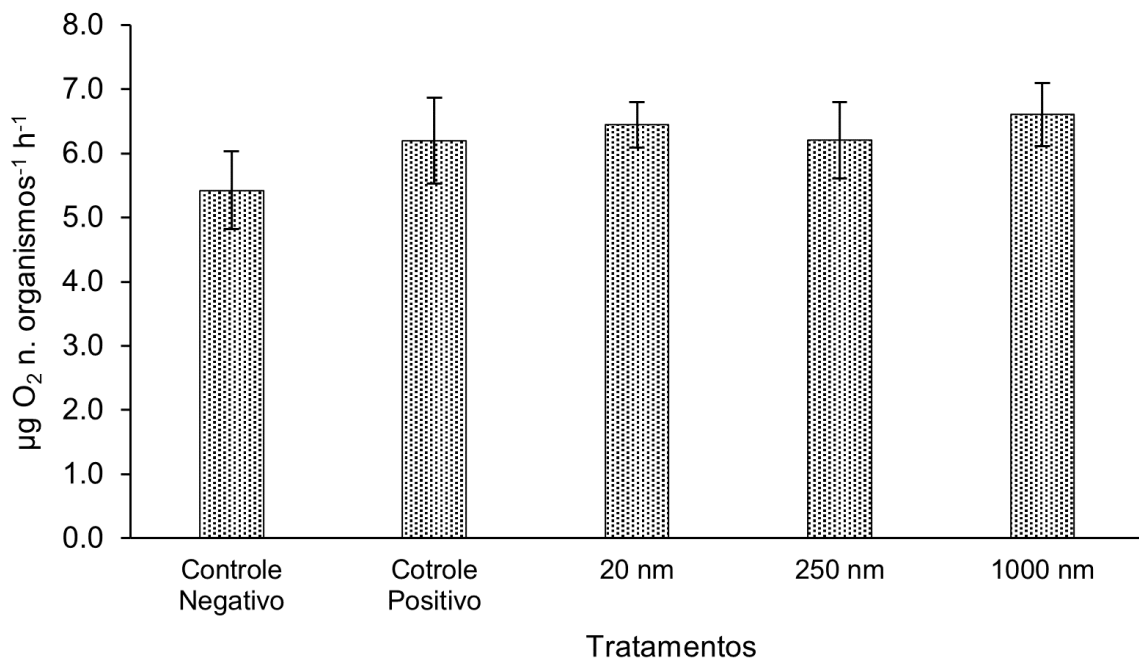
### 6.3.2. Aplicação do método para identificação de hemócitos

#### *Ensaio de Respirometria*

Não foi observado diferença estatística significativa no consumo de oxigênio entre os tratamentos e controles (Figura 4). No estudo de Bruck e Ford (2018), *E. marinus* foram expostos a micropartículas de poliestireno (8 µm), e o consumo de alimento, o crescimento e o comportamento de muda foram observados. No entanto, nenhum efeito significativo foi observado no consumo alimentar e crescimento, e não houve acúmulo de microplásticos no intestino. Segundo os autores, o baixo número de microplásticos no intestino pode estar

relacionada às funções gastrointestinais dos anfípodes, que permitem a fácil ingestão e excreção de itens indigestos, uma vez que expostos a altas doses, 60% de *E. marinus* excretaram todas as microesferas em 24 horas. Possivelmente, ocorreu o mesmo comportamento no experimento do presente estudo, mesmo sendo partículas de tamanhos diferentes.

**Figura 4.** Consumo de oxigênio de *Echinogammarus marinus* expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias.



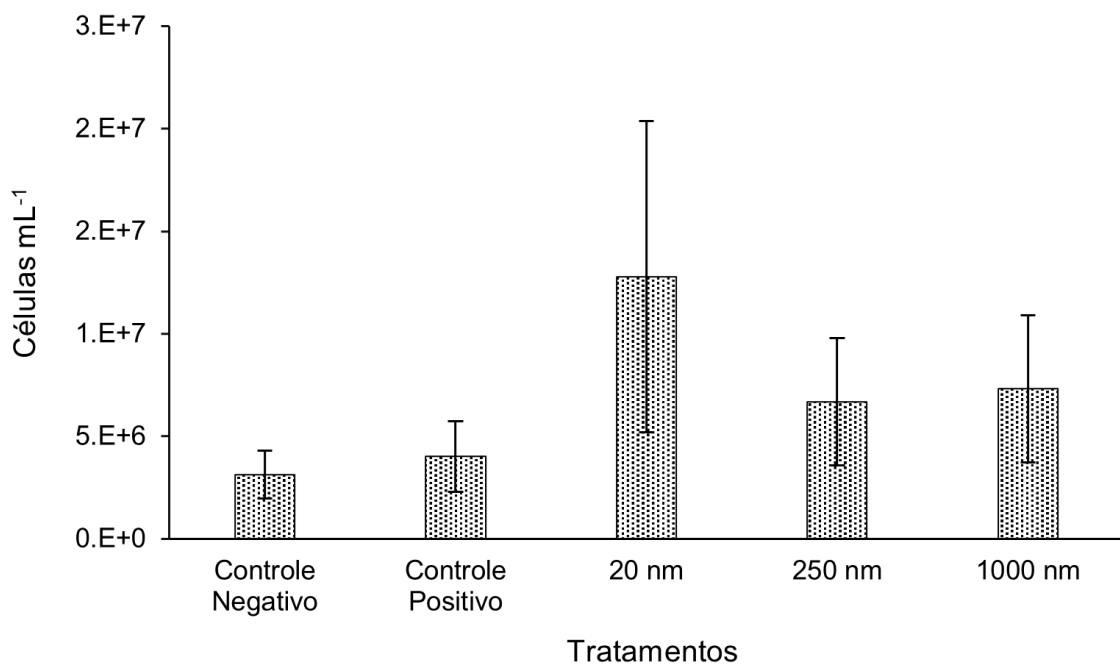
#### *Contagem total e diferencial das células*

Após a contagem total de células, não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos e os controles (Figura 5), concordando com os resultados obtidos no ensaio de respirometria.

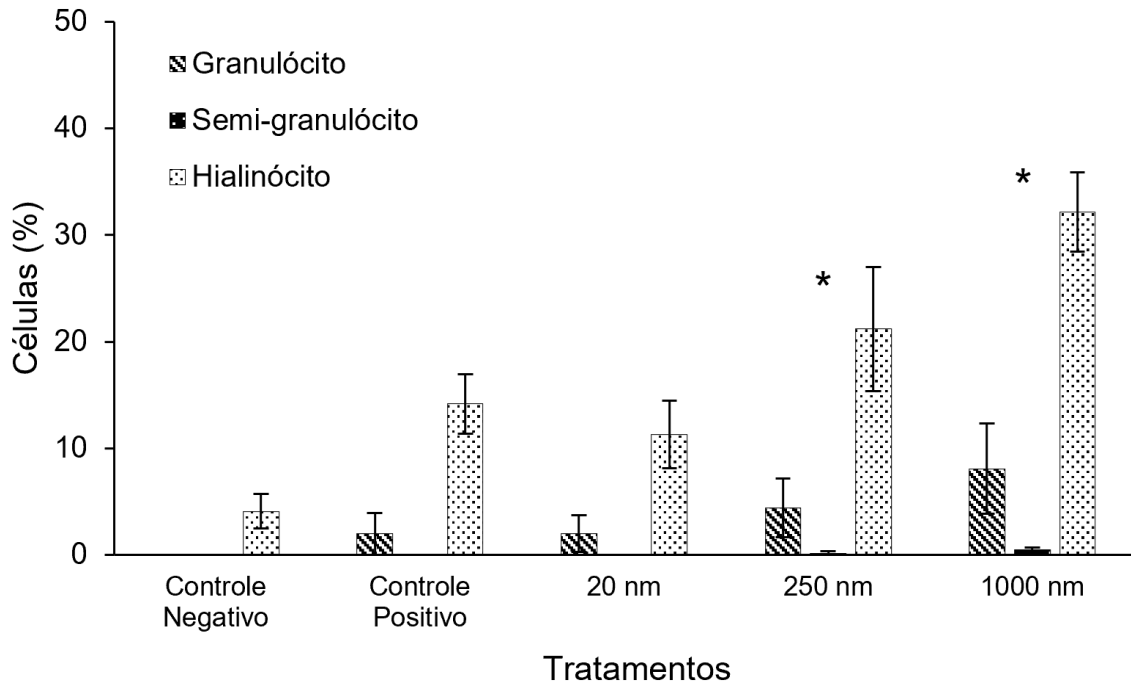
Na contagem dos diferentes tipos de hemócitos foi possível verificar uma diferença estatística significativa entre os organismos expostos às partículas de 250 nm e 1000 nm em relação ao controle negativo (Figura 6). Hialinócito foi o tipo de hemócito mais abundante. As funções das células hialinas são a realização de fagocitose e a geração de espécies reativas de oxigênio (BELL; SMITH, 1993; SMITH; RATCLIFFE, 1978), com base nisso sugere-se que as partículas de poliestireno poderiam ser fagocitadas pelas células, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Outro efeito observado foi a degranulação celular, que também é uma função derivada dos tipos de hemócitos granular e semi-granular (SMITH;

RATCLIFFE, 1978), no entanto esse efeito também foi observado nos controles, e como não é possível mensurar a degranulação, não foi possível verificar se houve alguma diferença entre os tratamentos e controles. Sabe-se que os microplásticos podem induzir respostas imunológicas de uma perspectiva terapêutica. O microplástico pode ser internalizado em células e tecidos através de endocitose ou pinocitose, que pode ser influenciada pelo tamanho, forma e química da superfície da partícula de plástico. A localização de uma partícula estranha pode subsequentemente causar inflamação (WRIGHT, 2015). Assim, mais estudos devem ser desenvolvidos para confirmar os efeitos dos microplásticos no sistema imune dos organismos aquáticos.

**Figura 5.** Contagem celular total da hemolinfa de *Echinogammarus marinus* expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias.



**Figura 6.** Porcentagem dos diferentes tipos de hemócitos da hemolinfa de *Echinogammarus marinus* expostos a 5% de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos (20nm, 250nm, 1000nm), após 14 dias.



\*Indica diferenças significativas entre os diferentes tipos de microplásticos.

### 6.3.3. Quantificação de microplásticos em amostras de água do mar

#### *Digestão de amostras, medida e contagem de fibras*

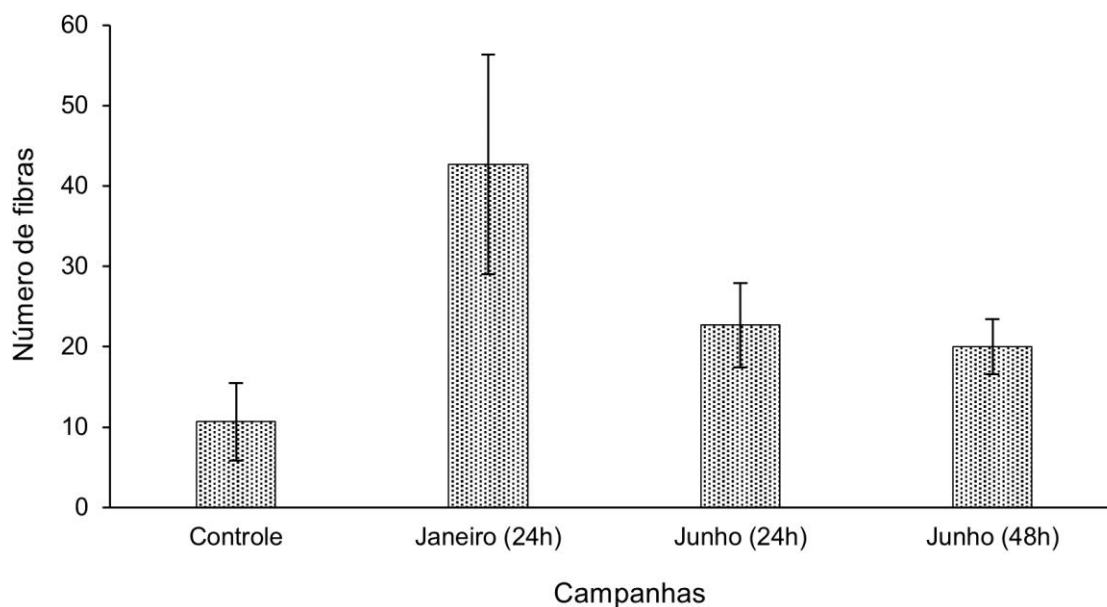
Foi possível separar os plásticos das amostras, utilizando o método de digestão empregado. Ao testar dois diferentes tempos de digestão (24 e 48 horas) nas amostras da mesma campanha (junho) foi possível verificar que não há diferença estatística no número de fibras das amostras (Figura 7).

Segundo Catarino et al. (2018) que avaliaram a presença de microplásticos em mexilhões, o uso de brancos é de grande importância, devido à contaminação por fibras aéreas, e por isso subtraíram o número de fibras encontradas nos controles do número de fibras encontradas nas amostras. Após a subtração das fibras encontradas no controle obteve-se de 0,01 a 0,09 fibras L<sup>-1</sup> nas amostras coletadas em St Abbs. Foram encontradas diferentes cores (vermelho, azul, preto) de fibras nas amostras, e geralmente no controle as fibras eram transparentes como relatado em Catarino et al. (2018). Outra ferramenta que pode ser utilizada para diferenciar a contaminação das fibras transportadas pelo ar das amostras é o comprimento das fibras, pois

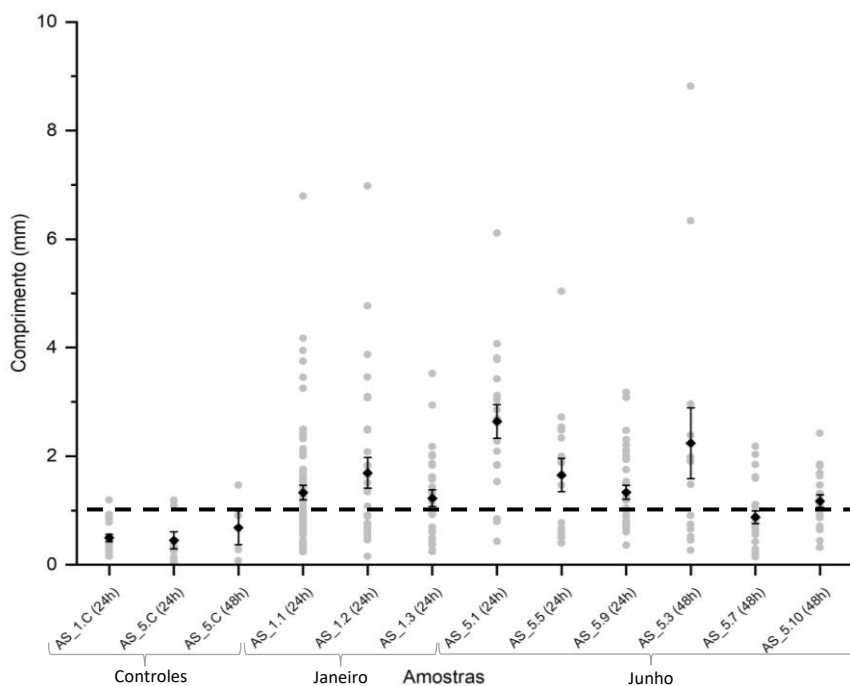


observou-se que o comprimento das fibras das amostras foi maior que o comprimento das fibras dos controles (branco), conforme pode ser observado na figura 8.

**Figura 7.** Número de fibras encontradas em cada campanha, após diferentes tempos de digestão das amostras.



**Figura 8.** Comprimento das fibras (mm) dos controles e de cada amostra, das duas campanhas e nos diferentes tempos de digestão.



\*A linha tracejada indica o maior desvio-padrão obtido da média de um dos controles, indicando que as médias do comprimento das fibras das amostras coletadas em St Abbs ficaram acima.

### *Recuperação da digestão*

O resultado do experimento de recuperação pode ser observado na tabela 2. Foram utilizadas fibras naturais (como linho, lã de Merino, lã) e sintéticas (como acrílico, *lyocell*, espuma de poliéster, viscose, cordas) como padrões para verificar o efeito do processo de digestão. Com os resultados obtidos foi possível verificar que as fibras não são afetadas pelo processo de digestão, pois as taxas de recuperação das fibras foram em sua maioria de 100%. A taxa de recuperação da lã foi de 0%, então realizou-se o processo de digestão com uma quantidade maior de lã, e foi possível encontrar as fibras de lã após o processo.

**Tabela 2.** Taxa de recuperação do processo de digestão das fibras padrão.

| <b>Fibra (Padrão)</b> | <b>Fibras adicionadas<br/>(unid.)</b> | <b>Fibras recuperadas<br/>(unid.)</b> | <b>Taxa de<br/>recuperação (%)</b> |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Linho                 | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Lã de merino          | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Lã                    | 5                                     | 0                                     | 0                                  |
| Acrílico              | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| <i>Lyocell</i>        | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Esponja de poliéster  | 5                                     | 4                                     | 80                                 |
| Viscose               | 5                                     | 11 <sup>(a)</sup>                     | 220                                |
| Viscose ‘Marigold’    | 5                                     | 5 <sup>(b)</sup>                      | 100                                |
| Corda 1               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 2               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 3               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 4               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 5               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 6               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 7               | 5                                     | 5                                     | 100                                |
| Corda 12              | 5                                     | 5                                     | 100                                |

<sup>(a)</sup> Encontrados em pequenos pedaços; <sup>(b)</sup> Partiram quando foram manipulados para contagem.

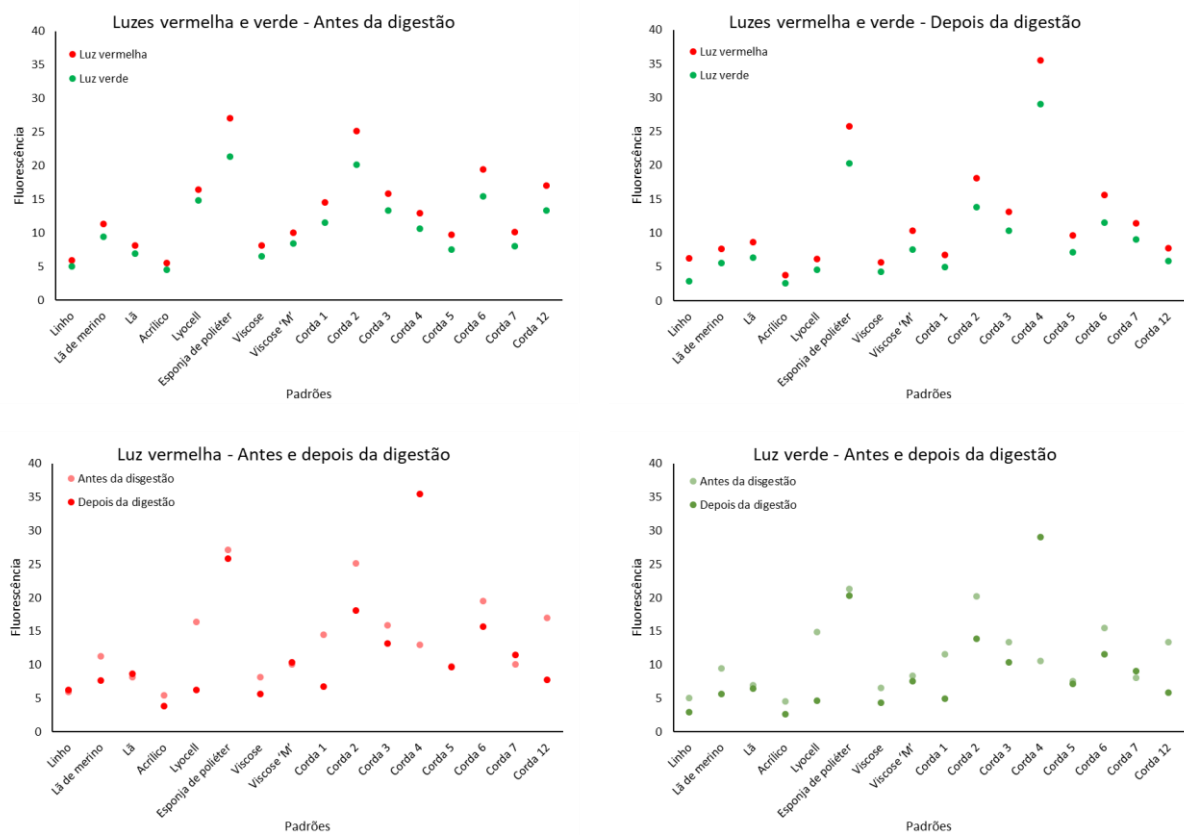
### *Método para identificação das fibras (padrão)*

Para o desenvolvimento do método para identificar os tipos de fibras usando o corante fluorescente do *Nile Red*, foram utilizadas as mesmas fibras padrão mencionadas no item anterior. Para a identificação da fluorescência da coloração das fibras com o *Nile Red*, alguns

estudos utilizaram diferentes configurações de luz e filtro. Segundo Shim et al. (2016) a fluorescência verde-amarelo (excitação e emissão a 450-490 e 515-565 nm, respectivamente) proporcionaram melhor reconhecimento de partículas do que a fluorescência vermelha ou azul. No estudo de Maes et al. (2017), dependendo do tipo de polímero, obtiveram boa fluorescência em comprimentos de onda mais longos, variando de amarelo a laranja. Erni-Cassola et al. (2017) obtiveram melhor fluorescência de polímeros sintéticos em filtros de luz verde (excitação e emissão a 460 e 525 nm, respectivamente). Neste estudo, foram utilizados dois tipos de filtros, um com maior comprimento de onda de excitação e emissão, chamado mCHER (excitação e emissão a 540-580 e 593-667 nm, respectivamente) e outro, denominado GFP (excitação e emissão a 450-490 e 500-550 nm, respectivamente), ambos na luz vermelha e verde. Ao contrário dos outros estudos, neste trabalho obteve-se melhor fluorescência usando o filtro mCHER de maior comprimento de onda de excitação e emissão. Usando este filtro e luzes diferentes (vermelho e verde), pode-se observar que a luz vermelha permitiu uma fluorescência ligeiramente melhor, conforme figura 9 (A e B). Segundo Rumin et al. (2015), o corante *Nile Red* favorece a detecção de amostras fortemente hidrofóbicas em comprimentos de onda curtos de excitação e emissão (450-500 e  $\leq 580$  nm, respectivamente) em comparação com lipídios mais neutros, idealmente visualizados em comprimentos de onda de excitação e emissão maiores (isto é, vermelho, 515-560 e  $\geq 590$  nm, respectivamente). Assim, possivelmente as fibras utilizadas neste trabalho tenham características mais neutras.

Para verificar se o processo de digestão modificava a fluorescência da fibra, foram realizadas medidas de fluorescência das fibras coradas com *Nile Red*, antes e depois da digestão. Foi possível verificar que, para a maioria das fibras, ocorreu uma pequena redução na fluorescência, conforme figura 9 (C e D). No estudo de Erni-Cassola et al. (2017), após a digestão, a quitina apresentou um forte decréscimo na intensidade de fluorescência verde e atribuíram isso à uma possível redução da hidrofobicidade em resposta à oxidação. Para estudos futuros, recomenda-se a identificação de alguma característica específica (por exemplo, hidrofobicidade) de cada fibra padrão e correlacionar com a fluorescência encontrada, desta forma seria possível identificar o tipo de fibra das amostras ambientais, como as amostras coletadas em St Abbs.

**Figura 9.** Fluorescência das fibras padrão em diferentes luzes (vermelho e verde), antes e depois do processo de digestão.



#### 6.4. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um método para observar os diferentes tipos de hemócitos da hemolinfa do anfípode marinho *E. marinus*. Na aplicação do método, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos e o controle, em relação a contagem total de células e na respirometria, após a exposição dos anfípodas às partículas de poliestireno via comida. Na contagem diferencial dos tipos de células, houve um aumento dos hialinócitos, porém mais estudos são necessários para entender o efeito dos microplásticos no sistema imune dos anfípodas.

Para a quantificação de microplásticos em amostras de água do mar, foi possível separar e contar as fibras das amostras, porém não foi possível identificar os tipos de fibras, utilizando as técnicas empregadas. Os conhecimentos obtidos sobre as respostas imunes puderam ser aplicados para caracterização dos hemócitos de *Parhyale hawaiiensis*.

## 6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SID-CHEIKH, M. et al. Synthesis of <sup>14</sup>C-labelled polystyrene nanoplastics for environmental studies. **Communications Materials**, v. 1, n. 1, p. 97, 4 dez. 2020.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596–1605, ago. 2011.
- ARTAL, M. C. et al. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 103–108, 15 mar. 2018.
- BELL, K. L.; SMITH, V. J. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 17, n. 3, p. 211–219, maio 1993.
- BRUCK, S.; FORD, A. T. Chronic ingestion of polystyrene microparticles in low doses has no effect on food consumption and growth to the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*? **Environmental Pollution**, v. 233, p. 1125–1130, fev. 2018.
- CATARINO, A. I. et al. Low levels of microplastics (MP) in wild mussels indicate that MP ingestion by humans is minimal compared to exposure via household fibres fallout during a meal. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 675–684, jun. 2018.
- CHUA, E. M. et al. Assimilation of Polybrominated Diphenyl Ethers from Microplastics by the Marine Amphipod, *Allorchestes Compressa*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 14, p. 8127–8134, 15 jul. 2014.
- COLE, M. et al. Microplastic Ingestion by Zooplankton. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 12, p. 6646–6655, 18 jun. 2013.
- COLE, M. et al. The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 1130–1137, 20 jan. 2015.
- COLE, M. A novel method for preparing microplastic fibers. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34519, 3 dez. 2016.
- DOS SANTOS, A. et al. Measuring concentrations of a dye in the hemolymph of a marine amphipod: Development of a protocol for exposure assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 175, n. October 2021, p. 113376, fev. 2022.
- ERNI-CASSOLA, G. et al. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 µm) in Environmental Samples. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 23, p. 13641–13648, 5 dez. 2017.
- HAYWARD, P. J.; RYLAND, J. S. **The Marine Fauna of the British Isles and North-West Europe**. v. 1 ed. Oxford: Clarendon Press, 1990.
- HICKEY, M. E.; LEE, J.-L. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 3, p. 585–610, ago. 2018.
- KING, C. K. et al. Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1466–1476, jun. 2006.
- LEACH, W. E. XXXI. A tabular View of the external Characters of Four Classes of Animals, which Linné arranged under Insecta; with the Distribution of the Genera composing Three of these Classes into Orders, &c. and Descriptions of several New Genera and Species. **Transactions of the Linnean Society of London**, v. 11, n. 2, p. 306–400, jan. 1815.
- MAES, T. et al. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44501, 16 dez. 2017.
- MELO, S. L. R.; NIPPER, M. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyschnopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 3, p.

- 412–420, mar. 2007.
- MESSINETTI, S. et al. Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 1080–1087, jun. 2018.
- NEUPARTH, T.; COSTA, F. O.; COSTA, M. H. Effects of Temperature and Salinity on Life History of the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. Implications for Ecotoxicological Testing. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 61–73, 2002.
- ROBB, C. T. et al. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4627, 13 dez. 2014.
- ROCHMAN, C. M.; REGAN, F.; THOMPSON, R. C. On the harmonization of methods for measuring the occurrence, fate and effects of microplastics. **Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 1324–1325, 2017.
- RUMIN, J. et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 42, 2015.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. . **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.
- SHIM, W. J. et al. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. **Marine Pollution Bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 469–476, dez. 2016.
- SMITH, V. J.; RATCLIFFE, N. A. Host Defence Reactions of the Shore Crab, *Carcinus Maenas* (L.), in Vitro. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 58, n. 02, p. 367, 11 maio 1978.
- SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 229–239, mar. 1983.
- SONG, Y. K. et al. Large Accumulation of Micro-sized Synthetic Polymer Particles in the Sea Surface Microlayer. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 16, p. 9014–9021, 19 ago. 2014.
- SUSSARELLU, R. et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 9, p. 2430–2435, 1 mar. 2016.
- SVENDSEN, M. B. S.; BUSHNELL, P. G.; STEFFENSEN, J. F. Design and setup of intermittent-flow respirometry system for aquatic organisms. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 26–50, jan. 2016.
- TAMMINGA, M. Nile Red Staining as a Subsidiary Method for Microplastic Quantification: A Comparison of Three Solvents and Factors Influencing Application Reliability. **SDRP Journal of Earth Sciences & Environmental Studies**, v. 2, n. 2, 2017.
- THOMPSON, R. C. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? **Science**, v. 304, n. 5672, p. 838–838, 7 maio 2004.
- VAN CAUWENBERGHE, L. et al. Microplastic pollution in deep-sea sediments. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 495–499, nov. 2013.
- VANNUCI-SILVA, M. et al. GFAAS and ICP-MS determination of Ag and Cu in the haemolymph of a millimetric marine crustacean (*Parhyale hawaiiensis*) as a tool in ecotoxicology. **Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 2, p. 67–74, 2018.
- WRIGHT, S. **The potential for microplastics to cause harm in the marine environment**. [s.l.] University of Exeter, 2015.
- WRIGHT, S. L. et al. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. **Current Biology**, v. 23, n. 23, p. R1031–R1033, dez. 2013.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de toxicidade crônica proposto para *Parhyale hawaiiensis*, tem potencial para integrar avaliações de risco ecológico para ambientes marinhos tropicais, porém mais testes com diferentes amostras são necessários para consolidar o protocolo desenvolvido. É importante destacar que o protocolo desenvolvido utiliza organismos cultivados com sucesso em laboratório, fornecendo grande número de organismos durante todo o ano para realização dos ensaios. A caracterização dos hemócitos poderá ser utilizada para melhor compreensão das funções imunológicas dessas células, além de fornecer a base para o desenvolvimento de *endpoints* em imunotoxicologia.

Durante o período do doutorado sanduíche, foi possível constatar a importância da caracterização adequada dos hemócitos, para poder entender os efeitos dos contaminantes no sistema imune dos organismos. Embora não tenha sido identificado nenhum efeito significativo na contagem dos hemócitos no teste realizado com *E. marinus* e partículas de poliestireno, a técnica aprendida pode ser útil em futuros experimentos com microplásticos ou outras partículas.

*P. hawaiiensis* é sem dúvida um modelo promissor em ecotoxicologia, e os parâmetros estudados neste trabalho complementam os protocolos já desenvolvidos. Porém, testes com diferentes substâncias e amostras ambientais deveriam ser realizados com esse modelo para sua consolidação.