

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS INIBIDORES DE
CORROSÃO BIOLÓGICOS GLUCONATO DE SÓDIO E NITRITO EM
SUAS FORMAS LIVRES E NANOESTRUTURADAS EM HIDRÓXIDOS
DE DUPLA CAMADA**

MARIANA BRUNI MARQUES DO PRADO E SILVA

**SÃO VICENTE – SP
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS INIBIDORES DE CORROSÃO
BIOLÓGICOS GLUCONATO DE SÓDIO E NITRITO EM SUAS FORMAS LIVRES
E NANOESTRUTURADAS EM HIDRÓXIDOS DE DUPLA CAMADA**

Discente: Mariana Bruni Marques do Prado e Silva

Docente orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientador: Dr. Roberto Carlos Domingues Martins

Co-orientador: Dr. Fernando César Perina

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

S586a

Silva, Mariana Bruni Marques do Prado e

Avaliação ecotoxicológica dos inibidores de corrosão biológicos Gluconato de Sódio e Nitrito em suas formas livres e nanoestruturadas em hidróxidos de dupla camada / Mariana Bruni Marques do Prado e Silva. -- , 2023

53 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente,

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

Coorientador: Roberto Carlos Domingues Martins

1. Ecotoxicologia. 2. Anticorrosivos. 3. Nanoestrutura. 4. Perigo ambiental.
5. LDH. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Denis Abessa, ao Dr. Roberto Martins, ao Dr. Fernando Perina e a empresa Smallmatek Lda. pelo projeto e por acreditarem em mim e no meu trabalho e por todo o auxílio e orientação durante todos esses anos. Mas mais que isso, por serem amigos e um espaço acolhedor sempre que precisei.

Agradeço aos meus amigos do NEPEA por toda a ajuda nos experimentos e no laboratório e a companhia nesses anos, mas especialmente a Juliana dos Santos, a Maria Luiza Regueira, a Thaisa Ralha, a Carolina Feitosa, ao Caio Ribeiro e a Maysa Ueda.

Agradeço muito todo acolhimento, apoio, ajuda e ensinamentos dos pesquisadores do CESAM nesse último ano, que me deram forças e inspiração para continuar fazendo ciência com o coração, principalmente ao Roberto, ao Fernando, a Joana, a Diana, ao Daniel, a Patrícia, ao Fábio, ao José, a Catarina, ao Diogo, a Maria e a Susana.

Agradeço aos meus amigos, Anna, Vinicius, Carolina, Miguel e Juliana por serem uma rede de apoio, principalmente emocional, por todos os momentos bons e ruins. Partilhar a vida com eles têm sido incrível.

Agradeço ao Roberto, a Tânia, ao Fernando, a Elaine e ao Juan, por serem mais que amigos, mas a minha família em Aveiro, principalmente no momento mais difícil da minha vida. Sem o apoio deles eu não teria conseguido ultrapassar essa fase da maneira mais tranquila possível. Tenho muita sorte de ter os encontrado na vida.

Agradecer a Luiza, minha irmã, e a Rosemary, minha mãe, não é o suficiente para expressar toda a gratidão, amor e admiração que tenho por elas e por permitirem e apoiarem a minha carreira que é um sonho de vida, por segurarem minha mão em todas as dificuldades e conquistas que tive em todos esses anos e por torcerem por mim e estarem comigo independente de qualquer coisa.

Agradeço a todas as mulheres cientistas que foram e são inspiração para mim, mesmo sem saber, mas em especial a Juliana dos Santos, a Mayana Fontes, a Carolina Feitosa, a Guacira Eufrásio, a Jeamylle Nilin, a Maria Pavlaki e a Susana Loureiro. Elas me fazem acreditar, apesar de todas as dificuldades, que mulheres podem ocupar todos os lugares e me fazem querer ser uma mulher na ciência todos os dias.

Agradeço as agências de fomento CAPES e FAPESP pelo financiamento deste projeto, me concedendo bolsas de mestrado (2021-10848-3) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE – 2022/15114-0). Com isso pude me dedicar à ciência e me desenvolver, não só profissionalmente, mas pessoalmente também. Agradeço também a FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), já que o presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto NANOGREEN (CIRCNA/BRB/0291/2019), financiado por fundos portugueses (OE).

RESUMO

O processo de corrosão metálica é uma das principais causas de degradação de estruturas e equipamentos no ambiente marinho. Esse problema tem sido minimizado pela utilização de inibidores de corrosão (IC), entretanto, devido a sua toxicidade, existe interesse em substituir estes compostos por alternativas igualmente eficientes, mas menos tóxicas, nomeadamente ICs de base biológica (bio-IC) e/ou base nanotecnológica. Pesquisadores da Universidade de Aveiro (UA) em parceria com a empresa portuguesa de I&D Smallmatek, Lda. desenvolveram nanomateriais manufacturados (NM) formados de hidróxidos de dupla camada (LDH) para imobilização de bio-ICs, visando aumentar a eficiência anticorrosiva e prolongar o tempo de meia-vida dessas substâncias e mitigar o lixiviamento precoce dos ICs, um problema técnico muito comum nas tintas modernas que são amplamente utilizadas em aplicações marítimas. Nesta sequência, no presente projeto foi realizada a avaliação ecotoxicológica de dois bio-IC, gluconato de sódio (SG) e nitrito (NO₂), nas formas livres e nanoestruturadas (LDH-SG; LDH-NO₂), assim como o nanomaterial base (LDH), utilizando espécies marinhas neotropicais. Foram feitos ensaios de toxicidade crônica, para avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento embriolarval de bolacha-do-mar (*Mellita quinquiesperforata*) e mexilhão (*Perna perna*), e na fecundidade com copépodos (*Nitokra* sp.). Os dados obtidos indicaram valores similares de Concentração de Efeito Observado (CEO) para os cinco compostos testados em *M. quinquiesperforata* e *P. perna*, apresentando efeitos a partir das concentrações mais baixas. Para *Nitokra* sp., a toxicidade dos compostos, com base nos valores do CEO, pode ser classificada na seguinte ordem decrescente: ZnAl-LDH-SG > ZnAl-LDH-NO₂ > ZnAl-LDH > SG e NO₂. Estes resultados são discordantes daqueles obtidos para organismos de ambiente temperado, nos quais ICs livres apresentam maior toxicidade do que suas respectivas formas nanoestruturadas. É importante a continuidade no estudo

dessas novas substâncias para melhor compreender o comportamento da nanoestrutura e liberação dos IC no ambiente, visando contribuir para o desenvolvimento de nanoaditivos anticorrosivos com alto desempenho e baixos riscos ambientais.

Palavras-chave: ecotoxicologia; anticorrosivos; nanoestrutura; perigo ambiental; LDH.

ABSTRACT

Metallic corrosion is the main cause of structures and equipments degradation in the marine environment. This problem has been minimized by the use of corrosion inhibitors (CI). However, due to their toxicity, there is an interest on replacing them by less toxic alternatives. Researchers from University of Aveiro (UA) in a partnership with a Portuguese I&D company Smallmatek, Lda. developed manufactured nanomaterials made of layered double hydroxides (LDH) to encapsulate the bio-CI, aiming at raising the anticorrosion efficacy of these compounds and to extend their half-life, mitigating the early leaching of the CIs, a very common technical problem in the modern paints that are widely used to marine purposes. In the present study an ecotoxicological evaluation of two bio-CI was performed, using sodium gluconate (SG) and nitrite (NO₂) in their free and nanostructured forms (LDH-SG; LDH-NO₂), as well as the base nanomaterial (LDH), using three neotropical marine species. Chronical toxicity assays were conducted to evaluate the effects over the sand dollar (*Mellita quinquiesperforata*) and mussel (*Perna perna*) embryolarval development, and in the fecundity of copepods (*Nitokra* sp.). The obtained data indicated similar Lowest Observed Effect Concentrations (LOEC) to the five tested compounds with *M. quinquiesperforata* and *P. perna*, showing effects since the lowest concentrations. For *Nitokra* sp., the compounds toxicity, based on the LOEC values, can be classified in a descending order: ZnAl-LDH-SG > ZnAl-LDH-NO₂ > ZnAl-LDH > SG and NO₂. These results differ of those obtained to temperate environment organisms, in which free CI presented higher toxicity than their respective nanostructured forms. It is important to continue the investigation of these new substances to better understand the nanostructure behavior and the CI release in the environment, contributing to the development of novel anticorrosive with a high performance and a low environmental risk.

Key words: ecotoxicology; anticorrosive; nanostructure; environmental hazard; LDH.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Siglas	11
1. Introdução	13
1.1. Ecotoxicologia	18
1.2. Organismos-Teste	19
1.2.1. <i>Mellita quinquiesperforata</i>	19
1.2.2. <i>Perna perna</i>	19
1.2.3. <i>Nitokra</i> sp.	20
1.3. Hipótese e Objetivos	20
2. Materiais e Métodos	21
2.1. Preparo das Soluções	21
2.2. Avaliação da Toxicidade	21
2.2.1. Ensaio de Desenvolvimento Embrionário de Bolacha-do-Mar	21
2.2.2. Ensaio de Desenvolvimento Embrionário de Mexilhão	23
2.2.3. Ensaio de Fecundidade com Copépodos	24
2.3. Análise dos Resultados	25
3. Resultados	27
3.1. Desenvolvimento Embrionário de Bolacha-do-Mar	27
3.2. Desenvolvimento Embrionário de Mexilhão	28
3.3. Fecundidade de Copépodos	29
4. Discussão	32
5. Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40
Apêndice I	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenvolvimento embrionário de *Mellita quinquiesperforata* em exposição à ZnAl-LDH-SG (c) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) e suas partes livres (a, b e d) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa do desenvolvimento observado quando comparado com o controle. 30

Figura 2 Desenvolvimento embrionário de *Perna perna* em exposição à Gluconato de Sódio (a), ZnAl-LDH (b), ZnAl-LDH-SG (c), NO₂ (d) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa do desenvolvimento observado quando comparado com o controle. 31

Figura 3 Taxa de fecundidade (%) do copépodo estuarino *Nitokra* sp. em exposição à SG (a), ZnAl-LDH (b), ZnAl-LDH-SG (c), NO₂ (d) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa da taxa de fecundidade quando comparada com o controle. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentrações de Efeito Não Observado (CENO), Concentrações de Efeito Observado (CEO) e Concentrações de Efeito/Inibição a 50% dos Organismos (CE ₅₀ /CI ₅₀) para as três espécies expostas as cinco substâncias de estudo. n.d. = não determinado, 100%.....	33
Tabela 2 Tabela qualitativa utilizando conceitos adaptados por Blaise <i>et al.</i> (2008) a respeito da toxicidade de nanomateriais. A cor verde clara representa materiais nocivos (10-100 mg/L), o amarelo representa compostos tóxicos (1-10 mg/L) e o vermelho muito tóxicos (0,1-1 mg/L). Em todas as classificações foram utilizados os valores de CE ₅₀ ou CI ₅₀ , exceto para SG em <i>M. quinquesperforata</i> e ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO ₂ em <i>P. perna</i> , que foram utilizados os valores de CEO.....	35
Tabela 3 Dados retirados do estudo realizado por Santos 2023 e Martins <i>et al.</i> , 2017 acerca de valores de CE ₂₀ e CE ₅₀ do anticorrosivo MBT nanoestruturado e suas partes livres. O asterisco representa valor de CE ₂₀ quando não foi possível obter o de CE ₅₀	39
Tabela 4 Dados obtidos neste trabalho e estudo realizado por Beverari 2023, comparando os valores de CE ₅₀ . O asterisco indica o valor de CE ₂₅ quando não foi possível obter valor de CE ₅₀ . n.d. indica valores não determinados.....	40
Tabela 5 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com a fase embrionária de bolacha-do-mar <i>Mellita quinquesperforata</i> expostas a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.....	51
Tabela 6 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referentes ao experimento com a fase embrionária de bolacha-do-mar <i>Mellita quinquesperforata</i> expostas a NO ₂ e ZnAl-LDH-NO ₂	51
Tabela 7 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com desenvolvimento embrionário de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.	52
Tabela 8 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com desenvolvimento embrionário de mexilhões <i>Perna perna</i> expostos a NO ₂ e ZnAl-LDH-NO ₂	52
Tabela 9 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referente ao experimento sobre a taxa de fecundidade do copépodo estuarino <i>Nitokra</i> sp. expostos a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.	53
Tabela 10 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referente ao experimento sobre a taxa de fecundidade do copépodo estuarino <i>Nitokra</i> sp. expostos a NO ₂ e ZnAl-LDH-NO ₂	53

LISTA DE SIGLAS

PIB – Produto Interno Bruto

IC – Inibidores de Corrosão

bio-IC – Inibidores de Corrosão de base biológica

MBT – 2-mercaptobenzotiazol

NO₂ - Nitrito

SG – Gluconato de Sódio

UA – Universidade de Aveiro

NM – Nanomateriais Manufaturados

nm - Nanômetro

SiNC – Nanocápsulas Mesoporosas de Sílica

LDH – Hidróxidos Duplo Lamelares

µm - Micrometro

mg - Miligrama

L - Litro

mL - Mililitro

kHz – Kilohertz

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

KCl – Cloreto de Potássio

M - Molar

µL - Microlitro

h – Hora

CE₅₀ – Concentração de Efeito em 50% da População

CE₁₀ – Concentração de Efeito em 10% da População

CI₅₀ - Concentração de Inibição em 50% da População

CENO – Concentração de Efeito Não Observável

CEO – Concentração de Efeito Observável

ANOVA – Análise de Variância

1. Introdução

A corrosão metálica em estruturas e equipamentos expostos à água do mar é um problema crítico em termos de segurança civil, sendo um desafio econômico, técnico-científico e ambiental. Estudos realizados em diversos países indicam que os custos anuais da corrosão variam de 1% a 5% do produto interno bruto (PIB) entre diferentes nações ao redor do mundo. Em 2013, por exemplo, o custo global da corrosão foi estimado em US\$ 2,5 trilhões, o que equivale a cerca de 3,4% do PIB global (Koch *et al.*, 2016).

Os fatores que causam a corrosão podem ter diferentes naturezas, como física, química, eletroquímica e microbiológica. Os inibidores químicos desempenham um papel importante nas estratégias de proteção e mitigação para retardar a corrosão (Fink, 2012), adsorvendo íons e moléculas na superfície metálica, geralmente reduzindo a taxa de corrosão, bloqueando as reações anódicas e/ou catódicas (Palou *et al.*, 2014).

Os métodos preventivos atuais para combater a corrosão marítima incluem a combinação de proteção catódica com a aplicação de revestimentos protetores de polímeros e inibidores de corrosão (IC) (Loukil & Feki, 2020; Figueira, 2020). O propósito de adicionar IC em baixas concentrações se dá para atrasar a reação entre o metal e as espécies químicas corrosivas presentes no meio (Palou *et al.*, 2014).

Inicialmente, sais inorgânicos, como cromatos, fosfato de zinco, polifosfatos e ortofosfatos, foram usados como inibidores de corrosão, porém seu uso foi descontinuado ou não recomendado, devido à alta toxicidade (Singh & Bockris, 1996). Dentre os compostos atualmente aplicados em tintas marítimas, estão os sais de 2-mercaptobenzotiazol (MBT), benzotriazol (BTA) e seus derivados, fosfatos, nitritos e vanadatos (Sørensen *et al.*, 2009; Tedim *et al.*, 2010). Entretanto, estas substâncias apresentam diferentes níveis de toxicidade quando livres no ambiente natural (Liao *et al.*,

2018).

Além da toxicidade potencial, muitos dos compostos presentes nos inibidores não preenchem completamente os requisitos impostos pelos padrões de proteção ambiental, como ausência de toxicidade. Por isso, existe um grande interesse em substituí-los por alternativas eficazes não perigosas (Palou *et al.*, 2014). Nesse sentido, a substituição dos IC tradicionais por produtos “verdes” ou sustentáveis, com eficácia satisfatória é de extrema importância, sendo que pesquisadores de diversas áreas têm buscado alternativas adequadas visando cobrir estas lacunas. Recentemente, estudos mostraram o potencial do uso de moléculas de base biológica como anticorrosivos ambientalmente amigáveis, das quais algumas das mais promissoras incluíam gluconato de sódio (Zheludkevich *et al.*, 2013), extratos vegetais e ácidos aromáticos de derivados de lignina (Shen *et al.*, 2016), ácido glutâmico e outros aminoácidos (Hamadi *et al.*, 2018), e quitosana (Verma *et al.*, 2018).

A utilização de compostos orgânicos heterocíclicos para a inibição de corrosão vem crescendo devido a sua alta eficiência, custo-benefício, facilidade em aplicação e síntese. Entre esses compostos estão o nitrito (NO_2) e o gluconato de sódio (SG) que vêm sendo reportados como inibidores menos tóxicos que outros IC e efetivos para ferro e aço em sistemas de resfriamento de água (Verma *et al.*, 2020; Ou & Hsieh, 2016; Li *et al.*, 2015).

O gluconato de sódio age como um inibidor misto, inibindo os processos de corrosão anódicos e catódicos, mesmo tendo mais efeito sobre os anódicos (Li *et al.*, 2015). Estudos indicam que o SG serve como um potencial substituto na formulação de anticorrosivos, principalmente por sua boa capacidade de inibição de corrosão e do crescimento de micro-organismos em sistemas aquáticos (Ou & Hsieh, 2016; Hamadi *et al.*, 2018).

O mecanismo de inibição de corrosão do SG pode ocorrer pela adsorção de ânions de gluconato e formação de um filme protetor na superfície metálica, já que os grupos funcionais presentes no SG podem criar ligações com os átomos ou íons metálicos indicando uma forte quelação, suprimindo a ação anódica e retardando a corrosão (Li *et al.*, 2015; Serdaroglu *et al.*, 2020). Já o nitrito (NO_2) adsorvido no metal age neutralizando parcialmente a agressividade dos eletrólitos presentes no meio, evitando a corrosão (Verma *et al.*, 2020).

Estudos recentes conduzidos na Universidade de Aveiro (UA) em Portugal, em parceria com a empresa portuguesa Smallmatek Lda, levaram ao desenvolvimento de uma nova tecnologia utilizando nanomateriais manufaturados (NM) inteligentes. Esta tecnologia inovadora consiste no uso de NM para aprisionar substâncias químicas, inclusive algumas de reconhecida eficiência anticorrosiva, para serem usados como aditivos inteligentes em tintas de elevado desempenho que libertam os ingredientes ativos apenas mediante estímulos ambientais (e.g. alterações de pH, presença de cloretos), com a vantagem de diminuir ou anular os danos ambientais provocados pelos ICs (Martins *et al.*, 2017).

O uso da nanotecnologia na busca por compostos que atuem com alta especificidade (RCEP, 2008) é de grande interesse da comunidade científica global e de diversos setores econômicos. Por definição, um nanomaterial é constituído por 50% ou mais de partículas compreendidas entre 1 nm e 100 nm (EC, 2011). O crescente interesse pelos nanomateriais se dá, principalmente, pela grande relação entre superfície e volume que estes materiais apresentam, o que favorece inúmeras aplicações nas mais variadas áreas do conhecimento, e também podem exercer um papel importante na redução de impacto ambiental (RCEP, 2008).

As nanopartículas de prata, por exemplo, amplamente utilizadas pela sua ação

antimicrobiana, geralmente são menos tóxicas para espécies não-alvo que íons de prata e outros compostos a base de prata (Tayemeh *et al.*, 2020). O encapsulamento do biocida anti-incrustante DCOIT em nanocápsulas mesoporosas esféricas de sílica (SiNC-DCOIT), criado pela empresa portuguesa Smallmatek Lda, reduziu a toxicidade deste composto sobre espécies não-alvo (Figueiredo *et al.*, 2019; Santos *et al.*; 2020; Campos *et al.*, 2022). Isso gerou o aumento na meia-vida e a redução da quantidade dos biocidas utilizados na tinta, indicando assim o potencial dos NM como alternativas tecnológicas para aumentar a eficiência e reduzir os impactos ambientais associados a materiais de interesse econômico.

O presente estudo avaliou uma estratégia de base nanotecnológica semelhante àquela utilizada para o DCOIT, mas desta vez usada para minimizar os efeitos ambientais dos ICs, via imobilização dos compostos ativos em NM. Porém, neste estudo, ao invés de nanocápsulas de sílica, foram usados hidróxidos de dupla camada (LDH), também conhecidos como nanoargilas, que podem conter ingredientes ativos na forma aniônica, como por exemplo, ICs (Poznyak *et al.*, 2009; Zheludkevich *et al.*, 2010; Tedim *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012).

Os LDH são argilas de troca aniônica de duas dimensões, com um tamanho lateral entre 20 e 40 nm, compostos por camadas com óxidos metálicos de carga positivas e intercaladas com ânions (Tedim, *et al.*, 2010). Com uma fórmula geral de $[M^{2+}_{(1-x)} + M^{3+}_x(OH)_2]^{X+} (A^{n-})_{x/n}^{x-} \cdot mH_2O$, o M^{2+} é um cátion divalente, como o Zn^{2+} e o M^{3+} é um cátion trivalente, como o Al^{3+} , e o A^{n-} é um ânion, como os bio-ICs SG e NO_2 (Radwan *et al.*, 2022).

Os LDH possuem diferentes aplicações devido ao seu potencial catalítico, de troca aniônica, absorvância UV, retardante de chamas, aditivo polimérico, entre outras (Ghaleno *et al.*, 2023). Os ICs foram nanoestruturados nestes LDH devido os seus

potenciais de aplicação. Além de minimizar a ação dos compostos potencialmente danosos ao ambiente aquático, eles podem potencializar a eficiência de tintas marítimas anticorrosivas (Tedim *et al.*, 2010).

A imobilização dos ICs na forma aniônica nas LDH previne a interação dos compostos com outros componentes da tinta que podem levar a reações e perdas indesejadas de efeito protetor (Duanis-Assaf *et al.*, 2022). Outro aspecto positivo desta tecnologia é a liberação controlada de IC na água do mar, que ocorre em resposta às alterações do pH, força iônica, e presença de cloretos. A imobilização também fornece uma ação de autocura frente aos danos ao revestimento, ou seja, possui a capacidade de recuperar gradualmente as propriedades iniciais após uma ação destrutiva (Poznyak *et al.*, 2009; Tedim *et al.*, 2010; Zheludkevich *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012; Zheludkevich *et al.*, 2013).

Na busca por alternativas aos tradicionais ICs, os anticorrosivos inovadores precisam idealmente apresentar eficiência semelhante, bem como menor toxicidade quando imobilizados em LDH (Avelelas *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2017; Figueiredo *et al.*, 2019). Neste sentido, biomoléculas com propriedades anticorrosivas, como gluconato de sódio (SG), o qual é protegido por uma patente (Zheludkevich *et al.*, 2013) e o nitrito (NO₂) foram submetidos à mesma estratégia nanotecnológica, no intuito de aumentar a eficiência anticorrosiva dessas substâncias, mantendo níveis seguros para a biota marinha.

Esses NM inovadores estão sendo avaliados para diversos aspectos, incluindo os riscos ambientais, visando avaliar previamente o seu uso em revestimentos de proteção marítima, e consequente à produção futura em escala industrial. Assim, assumindo a entrada bem-sucedida de algumas dessas substâncias inovadoras no mercado de tintas marítimas, elas se tornarão presentes nos ecossistemas marinhos em algum grau, devido à liberação por lixiviação ou abrasão dos revestimentos.

1.1. Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é uma ciência integrativa que surgiu no final da década de 1960 unindo Ecologia, Toxicologia, Limnologia, Química, Estatística, dentre outras ciências. Ela permite estudar e avaliar efeitos de substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos, populações e comunidades animais, vegetais, terrestres ou aquáticas, assim como a interação dessas substâncias com o meio onde esses organismos estão inseridos (Zagatto, 2015). Os estudos ecotoxicológicos podem ser usados para identificar e avaliar efeitos estressores em diferentes níveis de organização biológica, desde níveis bioquímicos e moleculares, até comunidades e ecossistemas (Moore *et al.*, 2004).

A Ecotoxicologia possui diferentes instrumentos para avaliar efeitos de substâncias, sendo os ensaios de toxicidade as abordagens mais convencionais. Os ensaios de toxicidade são métodos padronizados, que ocorrem sob condições controladas, estabelecidos nacionalmente e/ou internacionalmente para que sejam amplamente replicados com organismos-teste selecionados. Estes ensaios podem ser realizados com substâncias ou misturas de substâncias de interesse ou ainda, com amostras ambientais de diferentes compartimentos (água, solo e sedimento) (Zagatto, 2015).

Esses ensaios ecotoxicológicos podem ser agudos ou crônicos, buscando estimar resultados de concentração-resposta após um período estabelecido em protocolo para a exposição dos organismos aos compostos de estudo. Os testes agudos são, normalmente, usados para avaliar efeito letal, normalmente em altas concentrações, quando organismos são expostos ao agente tóxico por um período relativamente curto em relação ao seu ciclo de vida. Já os testes crônicos envolvem a exposição por um período relativamente prolongado e em baixas concentrações, próximas as condições ambientais, e geralmente abrangem mais de uma fase do ciclo de vida dos organismos, visando identificar efeitos

subletais ou deletérios em níveis basais de organização biológica. Estes efeitos são identificados por alterações na reprodução, desenvolvimento, crescimento, mudanças bioquímicas e moleculares, entre outros. Nessa perspectiva, a ecotoxicologia se mostra uma ciência fundamental, principalmente por gerar informações para gestores ambientais e tomadores de decisões, sendo uma importante ferramenta no monitoramento ambiental, controle da poluição e na previsão de impactos e danos ao meio ambiente (Zagatto, 2015).

1.2. Organismos-Teste

A determinação dos organismos-teste para realização dos ensaios ecotoxicológicos é feita a partir da disponibilidade dos organismos, conhecimento de sua biologia, exequibilidade dos ensaios e sua conhecida sensibilidade a contaminantes, possibilitando a avaliação de efeitos em ensaios agudos e/ou crônicos. Também são consideradas a existência de protocolos já estabelecidos para a espécie ou família, o tamanho do ciclo de vida do organismo, e o manejo dele em laboratório (Zagatto, 2015).

1.2.1. *Mellita quinquiesperforata*

Bolachas-do-mar são equinodermos da espécie *Mellita quinquiesperforata* (Leske, 1778), elas possuem ampla distribuição geográfica, desde a costa dos Estados Unidos, Golfo do México e Brasil, até a costa oeste da Índia, sendo uma espécie de grande importância e abundância, encontradas em praias arenosas logo após a zona de arrebatção. São organismos bentônicos, possuem cerca de 5 cm de diâmetro e ciclo reprodutivo anual, desovando no final do inverno ou do verão (Laitano & Resgalla Jr., 2008).

Os ovos e estágios embrionários de equinodermos são muito utilizados em ensaios ecotoxicológicos crônicos devido a sua facilidade de reprodução em laboratório, a sua sensibilidade a poluentes e existência de protocolo padronizado de bioensaio para a família, com adaptações sugeridas para a espécie utilizada (Laitano & Resgalla Jr., 2008).

1.2.2. *Perna perna*

Os mexilhões da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) ocorrem na costa oeste do Atlântico, desde a Venezuela até o Uruguai, além do Golfo do México, podendo ser encontrados em substratos rochosos e possuem grande importância econômica devido a sua utilização como alimento (Narchi & Galvão-Bueno, 1997). Devido o seu valor econômico, utilização em monitoramento ambiental de poluentes, facilidade de obtenção, distribuição vasta e sensibilidade do estágio embrionário a compostos químicos, os bivalves são bastante utilizados em ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos (ABNT - NBR 16456, 2016).

1.2.3. *Nitokra* sp.

Nitokra sp. é um copépodo harpacticóide estuarino capaz de viver em diferentes salinidades, variando de 5 a 30, possuem um ciclo de vida curto, de aproximadamente 3 a 4 semanas, são abundantes, apresentam dimorfismo sexual e fazem um importante elo na cadeia alimentar (Santos, 2023). Além de serem organismos sensíveis a compostos químicos, são fáceis de serem cultivados em laboratório e podem ser utilizados para diversos ensaios ecotoxicológicos, tanto em água, já que são capazes de sobreviverem e se reproduzirem fora do sedimento, como em sedimento, tornando-se um ótimo organismo-teste (Artal, 2013).

1.3. Hipótese e Objetivos

A partir da hipótese de que os inibidores de corrosão de base biológica Gluconato de Sódio (SG) e Nitrito (NO₂) na forma nanoestruturada são menos ou tão tóxicos do que suas formas livres, o presente estudo visou comparar os efeitos ecotoxicológicos dos bio-ICs SG e NO₂ nas formas livres e nanoestruturadas (LDH-SG, LDH-NO₂) e avaliar a ecotoxicidade da nanoestrutura "vazia" (ZnAl-LDH) sobre espécies marinhas neotropicais. Para o efeito foram realizados testes de toxicidade crônica com embriões de

Mellita quinquesperforata (bolacha-do-mar) e *Perna perna* (mexilhão) e fêmeas ovadas do copépodo *Nitokra* sp. expostos aos compostos previamente citados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparo das Soluções

As dispersões/soluções-estoque foram preparadas em água do mar reconstituída (sal marinho *RedSea Salt*), filtrada em membranas de 0,45 e 0,22 μm consecutivamente após um mínimo de 12 horas de estabilização para dissolução dos sais, com salinidade 17 para a exposição dos copépodos *Nitokra* sp. e 35 para a exposição de embriões de bolachas-do-mar *M. quinquiesperforata* e mexilhões *P. perna*. Posteriormente, foram pesados os compostos de estudo para que todos tivessem 100 mg/L do composto base, considerando os conteúdos percentuais de IC nos nanomateriais. As soluções foram submetidas a um banho ultrassônico (40 kHz) por um período de 30 minutos para garantia da dispersão/solubilidade dos compostos em água salgada reconstituída (Figueiredo *et al.*, 2019). Imediatamente antes de cada exposição foi realizada a diluição seriada a partir das dispersões/soluções-estoque de 100 mg/L adotando fator 3 de diluição.

2.2. Avaliação da Toxicidade

Foram realizados ensaios de toxicidade crônica com embriões de bolacha-do-mar e mexilhões, assim como ensaios avaliando a taxa de fecundidade de copépodos, conforme as descrições a seguir.

2.2.1. Ensaio de Desenvolvimento Embrionário com Bolacha-do-Mar

Os ensaios de toxicidade com embriões de bolacha-do-mar foram realizados com base na Norma Técnica NBR 15350 (ABNT, 2020), com as adaptações propostas por Mello *et al.* (2020) para *Mellita quinquiesperforata*.

Indivíduos adultos foram coletados na praia do Itararé, em São Vicente (SP), e aclimatados no laboratório em água do mar natural e aeração constante por cerca de 4

horas. Após o período de aclimação, a indução da liberação dos gametas foi feita pela injeção de 1,5 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica de cada indivíduo.

A solução de esperma (0,5 mL de líquido espermático para 24,5 mL de água de diluição - salinidade 33 ± 2 , filtrada em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$) foi observada em microscópio óptico para avaliação da sua viabilidade (tamanho e movimentação). Paralelamente, uma subamostra dos óvulos de cada fêmea também foi observada em microscópio para avaliação de sua viabilidade (arredondados, lisos e de tamanho homogêneo).

Os gametas femininos viáveis foram "lavados" com água do mar reconstituída em uma malha de $75\ \mu\text{m}$ (três vezes) para a remoção de possíveis impurezas. Três alíquotas de $10\ \mu\text{L}$ da solução de gametas femininos foram analisadas em microscópio com auxílio de câmara Sedgewick-Rafter para determinar a concentração de ovócitos utilizada no processo de fertilização (média do número de gametas em $10\ \mu\text{L}$ de solução).

Após a fecundação, 1 mL da solução de óvulos fecundados foi diluída para o volume final de 100 mL com água de diluição. Foram expostos, aproximadamente, 500 ovos recém-fecundados em 10 mL de solução de cada concentração-teste e no controle negativo, em quadruplicata.

As concentrações utilizadas no ensaio com ZnAl-LDH-SG e suas partes livres foram obtidas através de testes preliminares realizados com a espécie de ouriço do mar *Paracentrotus lividus* realizada pela equipe da Universidade de Aveiro. Com isso foram estabelecidas as concentrações de exposição de 0,41; 1,23; 3,7; 11,1 e 33,3 mg de SG/L, feitas a partir de uma solução estoque, além do controle negativo (água do mar reconstituída). Já as concentrações utilizadas para o teste de nitrito livre e nanoestruturado foram as propostas inicialmente pelos coordenadores do projeto, sendo elas 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 e 100 mg de NO_2/L .

O período de exposição foi de 36 horas, sendo o teste mantido em câmara de germinação com fotoperíodo de 16:8h e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Ao final do experimento, foi adicionado formaldeído tamponado com bórax em cada réplica, visando preservar os respectivos estágios de desenvolvimento. As taxas de desenvolvimento de larvas pluteus normais foram verificadas pela observação dos 100 primeiros embriões em subamostras de cada réplica.

2.2.2. Ensaio de Desenvolvimento Embrionário com Mexilhão

Os ensaios de toxicidade crônica com embriões de *P. perna* seguiram a metodologia estabelecida pela norma NBR 16456 (ABNT, 2016). Organismos adultos foram coletados na região externa da Baía de Santos-SP, próximo à Ponta Grossa (Guarujá), e levados para o laboratório onde foram aclimatados em água do mar natural e aeração constante por cerca de 4 horas.

Para obtenção dos gametas, os animais foram submetidos à técnica de indução térmica (ABNT, 2016). Os animais foram dispostos em placas de petri e imersos em uma bandeja com água do mar filtrada (malha de $0,45\ \mu\text{m}$) e mantidos à temperatura de 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionada água aquecida a 37°C , configurando o choque térmico (Zaroni *et al.*, 2005; ABNT, 2016). Em seguida os animais foram retornados à temperatura de 25°C , para liberação dos gametas, identificados pela coloração alaranjada (óvulos) ou esbranquiçada (esperma).

A solução espermática (0,5 mL de líquido espermático para 24,5 mL de água de diluição) foi observada em microscópio óptico para avaliação da sua viabilidade. Paralelamente, uma subamostra dos óvulos de cada fêmea também foi observada em microscópio para avaliação de sua viabilidade.

Os gametas femininos viáveis foram "lavados" com água de diluição (salinidade 33 ± 2 , filtrada em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$) em uma malha de $75\ \mu\text{m}$ (três vezes) para a

remoção de possíveis impurezas. Três alíquotas de 10 μL da solução de gametas femininos foram analisadas em microscópio com auxílio de câmara Sedgewick-Rafter para determinar a concentração de ovócitos utilizada no processo de fertilização (média do número de gametas em 10 μL de solução).

Após a fecundação, 1 mL da solução de óvulos fecundados foi diluída para o volume final de 100 mL com água do mar reconstituída. O volume de solução necessário foi obtido pela média da contagem em 10 μL da solução de ovos (três observações), multiplicada por 100 (fator de diluição). Esse volume foi, então, acrescentado aos tubos de ensaio contendo soluções/dispersões-teste.

Foram expostos cerca de 400 ovos fecundados em cada réplica, tendo sido preparadas quatro réplicas para cada concentração das substâncias estudadas. Durante o período de exposição (48h), os tubos foram mantidos em câmara de germinação com fotoperíodo de 12:12h (claro/escuro), e temperatura controlada ($25\pm 2^\circ\text{C}$). O teste foi encerrado pela adição de formaldeído tamponado com bórax, e foi verificada a taxa de desenvolvimento de larvas D (veliconcha) normais.

As soluções/dispersões-teste tiveram concentrações similares às utilizadas nos ensaios com bolacha-do-mar expostas ao NO_2 e ZnAl-LDH-NO_2 , sendo elas 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 e 100 mg/L, tanto para o composto nanoestruturado, como para suas partes livres. Essas mesmas concentrações também foram utilizadas para os ensaios com copépodos.

2.2.3. Ensaio de Fecundidade com Copépodos

Copépodos da espécie *Nitokra* sp. foram utilizados em testes de toxicidade crônica considerando a fecundidade como *endpoint*, seguindo a norma NBR 16723 (ABNT, 2021). Este teste consistiu na exposição de 5 fêmeas ovadas retiradas de um cultivo mantido no Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) a

$25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e salinidade a 17 ± 2 e expostas em recipientes com 10 mL de solução/dispersão-teste para cada concentração e controle enegativo (apenas água do mar reconstituída) em quadruplicatas.

O tempo de exposição foi de 7 dias, com o teste conduzido em câmara de germinação com fotoperíodo de 8:16h (claro/escuro) e temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, com adição de 50 μL de levedura (fermento Fleischman) homogeneizada em água no início da exposição. Ao final do experimento, o material foi fixado e corado pela adição de formaldeído tamponado com bórax e Rosa de Bengala (0,1%). Posteriormente, foi feita a identificação e contagem do número de fêmeas e prole (náuplios e copepoditos), para determinação da taxa de fecundidade em cada tratamento.

As taxas de fecundidade das fêmeas ovadas após 7 dias de exposição foram calculadas por meio da soma do número de náuplios e copepoditos (F1) dividido pelo número de fêmeas.

2.3. Análise dos Resultados

Sempre que possível, para cada espécie e composto testado, estimou-se um conjunto de descritores com relevância ecotoxicológica.

Os valores de CE_{50} e CI_{50} , isto é, concentrações de efeito (CE) ou de inibição (CI) a 50% dos organismos expostos, ou a 10% dos organismos expostos quando não foi possível obter para 50%, foram estimados a partir das curvas dose-resposta através de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.

A concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) foram derivadas por análise de variância de uma via (ANOVA). Primeiramente foram verificados os pressupostos da ANOVA, nomeadamente de normalidade e homocedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilks e Bartlett. Posteriormente, correu-se a ANOVA, seguido do teste de Dunnet, ou equivalentes não

paramétricos quando necessário (com prévia transformação de dados), sempre que o valor do $p < 0.05$, utilizando o software GraphPad Prism 5.

3. Resultados

3.1. Desenvolvimento Embrionário de Bolacha-do-Mar

Os parâmetros físico-químicos, como pH, salinidade e oxigênio dissolvido, apresentados nas Tabelas 5 e 6 (Apêndice I), tiveram valores aceitáveis para a espécie. Todas as concentrações de ZnAl-LDH-SG são expressas pela quantidade de SG, assim como as concentrações de ZnAl-LDH-NO₂ são expressas pela quantidade de NO₂, afim de comparar com as concentrações dos ICs livres.

Os resultados do controle negativo observados após 36 horas de exposição foram de 88,1±5,1% de desenvolvimento embrionário normal para o ensaio realizado com ZnAl-LDH-SG e suas formas livres e de 70±5,8% no ensaio realizado com ZnAl-LDH-NO₂ e NO₂.

Os dados calculados apresentaram valores de CENO de <0,41 mg/L para ZnAl-LDH-SG, <1,23 mg/L para ZnAl-LDH-NO₂, 1,23 mg/L para SG e ZnAl-LDH, e 11,1 mg/L para NO₂. Já os valores de CEO foram de 0,41 mg/L para ZnAl-LDH-SG, 1,23 mg/L para ZnAl-LDH-NO₂, 3,7 mg/L para SG e ZnAl-LDH, e 33,3 mg/L para NO₂, como podemos observar na Figura 1.

Como houve desenvolvimento normal superior a 50% em todas as concentrações utilizadas na exposição ao SG, não foi possível calcular um valor de CE₅₀, porém foi obtido valor de CE₁₀ de 4,31 mg/L (1,94 – 9,61) . Para o restante dos compostos foram obtidos valores de CE₅₀ de 0,86 mg/L (0,43 – 1,73) para ZnAl-LDH-NO₂, 1,38 mg/L (1,08 – 1,76) para ZnAl-LDH-SG, 3,15 mg/L (1,89 – 5,25) para NO₂ e 5,77 mg/L (3,75 – 8,86) para ZnAl-LDH.

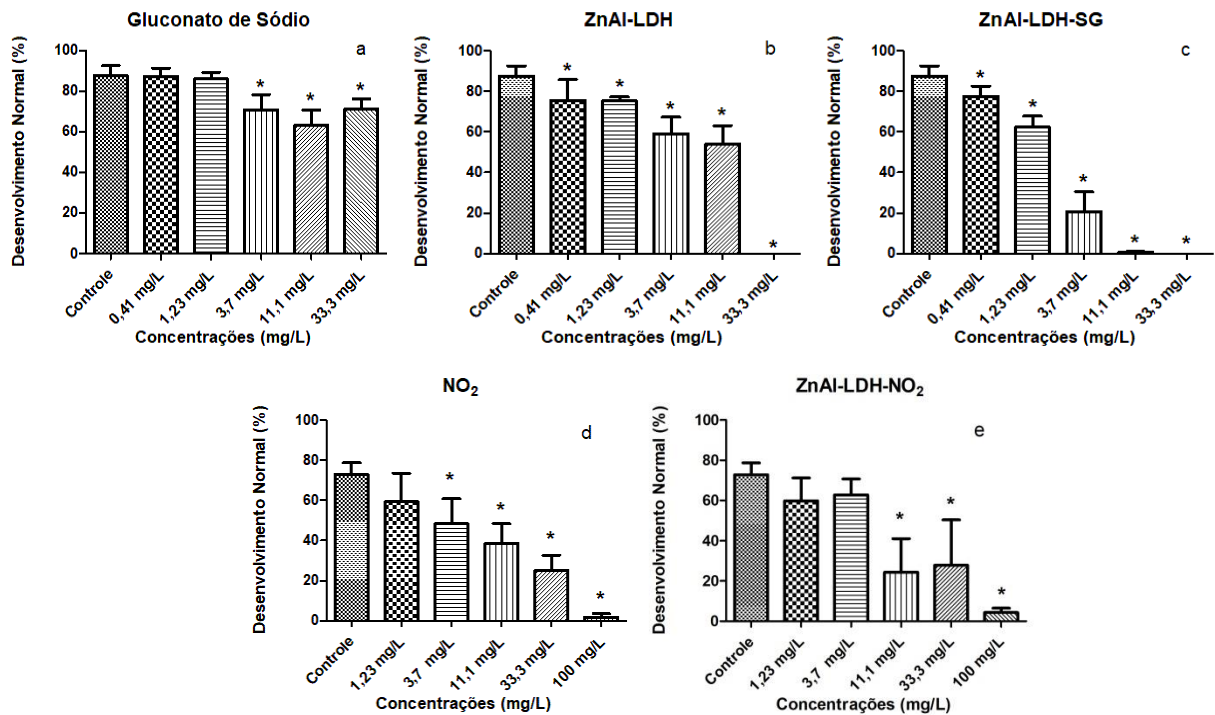


Figura 1 Desenvolvimento embrionário de *Mellita quinquiesperforata* em exposição à ZnAl-LDH-SG (c) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) e suas partes livres (a, b e d) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa do desenvolvimento observado quando comparado com o controle.

3.2. Desenvolvimento Embrionário de Mexilhão

Os parâmetros físico-químicos das soluções/dispersões-teste, apresentados nas Tabelas 7 e 8 (Apêndice I), estavam dentro do padrão para a espécie testada.

Os resultados de desenvolvimento embrionário normal no controle negativo após 48 horas de exposição foram de $78,29 \pm 9,8\%$, para o teste com ZnAl-LDH-SG nanoestruturado e suas partes livres e de $72,8 \pm 5,9\%$ para o ensaio realizado com ZnAl-LDH-NO₂ e NO₂, sendo utilizados para comparação com os resultados obtidos da exposição dos compostos.

Foram obtidos valores de CEO de $<1,23$ mg/L para SG, ZnAl-LDH, ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂, e de $33,3$ mg/L para NO₂ e valores de CENO de $1,23$ mg/L para SG, ZnAl-LDH, ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂ e de 100 mg/L para NO₂, como podemos observar na Figura 2.

Como não houve nenhum desenvolvimento normal na exposição ao ZnAl-LDH-

SG e ao ZnAl-LDH-NO₂, não foi possível obter valores de CE₅₀ para estes compostos, mas foram obtidos valores de 0,26 mg/L (0,22 – 0,32) para ZnAl-LDH, de 1,48 mg/L (0,19 – 11,35) para SG e de 19,52 mg/L (15,58 – 24,47) para NO₂.

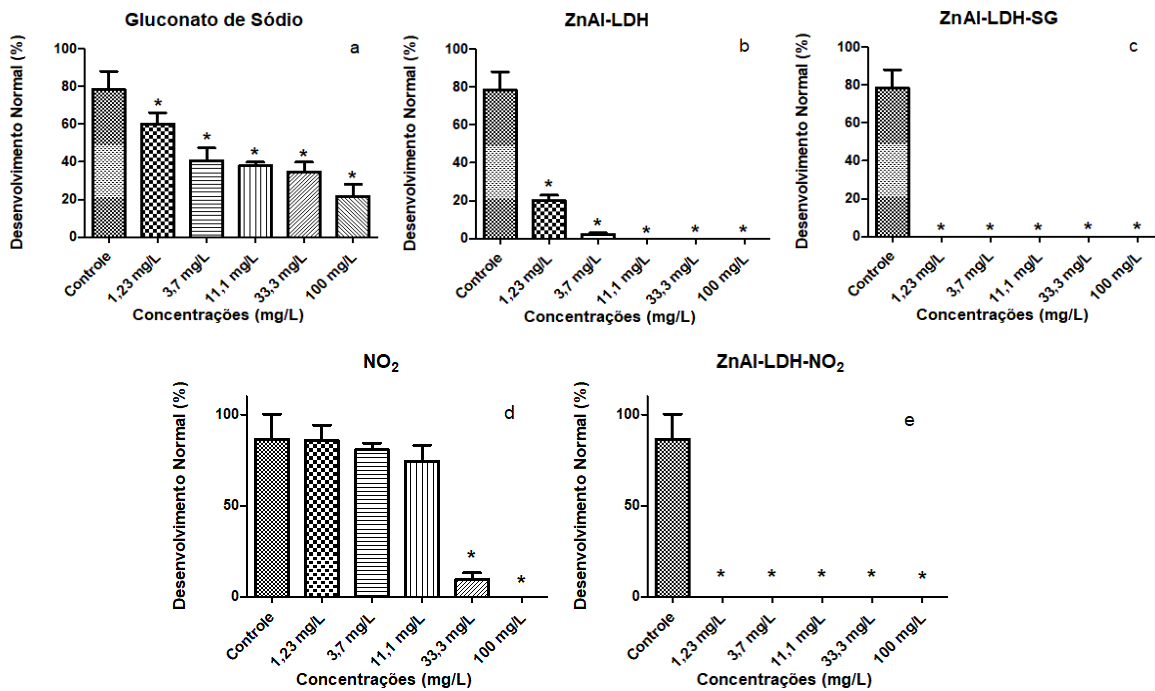


Figura 2 Desenvolvimento embrionário de *Perna perna* em exposição à Gluconato de Sódio (a), ZnAl-LDH (b), ZnAl-LDH-SG (c), NO₂ (d) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa do desenvolvimento observado quando comparado com o controle.

3.3. Fecundidade de Copépodos

Os parâmetros físico-químicos, indicados nas Tabelas 9 e 10, medidos no início e final do ensaio, foram adequados para a espécie, porém ao se tratar de um teste preliminar no caso do ZnAl-LDH-SG, SG e ZnAl-LDH, apenas a menor e a maior concentração de cada composto foram medidas.

Os resultados observados no controle negativo para a exposição com ZnAl-LDH-SG e suas partes livres foram de 20,2±6,6 organismos/fêmea, média que foi utilizada para comparação com os resultados das exposições dos três compostos. Já para a exposição com NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂ a média de organismos/fêmea foi de 10±0,8. Todos os valores dos dados brutos foram transformados em porcentagem para facilitar a visualização dos efeitos

na figura, onde o valor de 100% foi igual ao maior valor observado.

As concentrações de CENO observadas foram de <1,23 mg/L para ZnAl-LDH-SG, 11,1 mg/L para ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-NO₂ e de 33,3 mg/L para SG e NO₂. Já as concentrações CEO foram de 1,23 mg/L, 33,3 mg/L e 100 mg/L, respectivamente, como apresentado na Figura 3.

Neste caso, como o endpoint observado foi a inibição da fecundidade, obtivemos, também através de regressão não-linear, valores de CI₅₀ de 0,94 mg/L (0,32 – 2,81) para ZnAl-LDH-SG, 15,04 mg/L (9,05 – 25,0) para ZnAl-LDH, 18,08 mg/L (9,16 – 35,68) para ZnAl-LDH-NO₂, 40,5 mg/L (15,0 – 109,2) para SG e 41,54 mg/L (19,85 – 86,94) para NO₂.

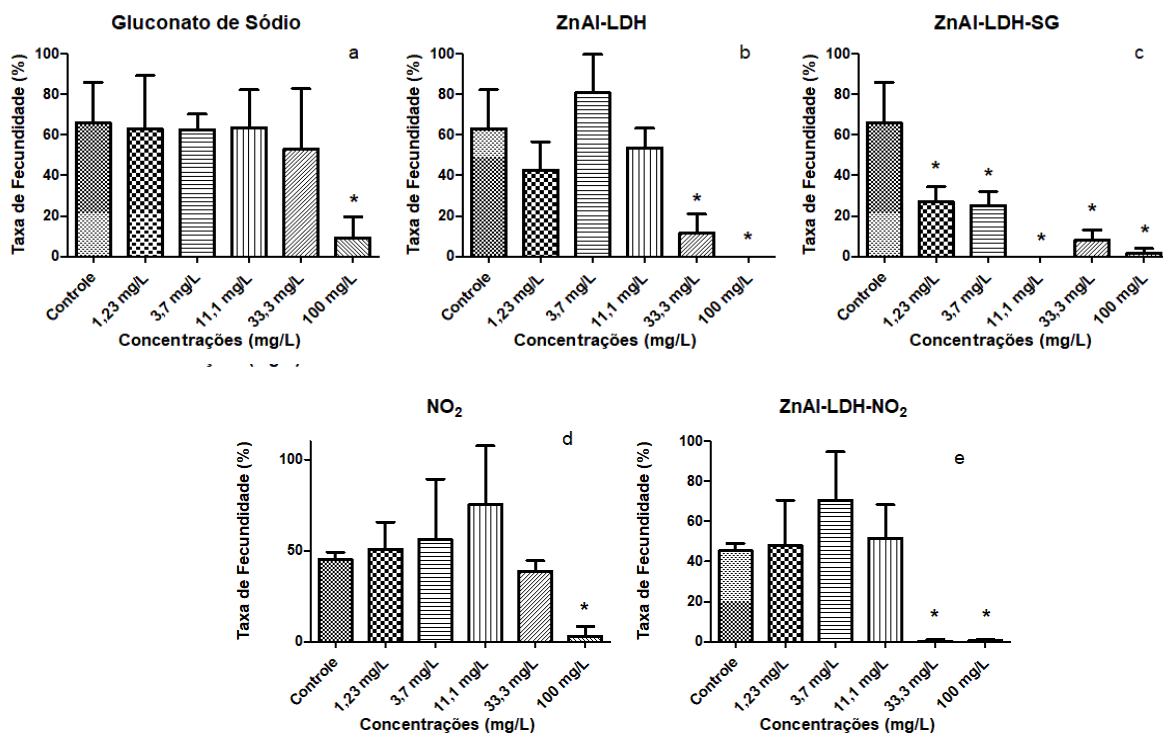


Figura 3 Taxa de fecundidade (%) do copépodo estuarino *Nitokra sp.* em exposição à SG (a), ZnAl-LDH (b), ZnAl-LDH-SG (c), NO₂ (d) e ZnAl-LDH-NO₂ (e) em cinco diferentes concentrações, além do controle negativo. O asterisco (*) representa diferença significativa da taxa de fecundidade quando comparada com o controle.

Tabela 1 Concentrações de Efeito Não Observado (CENO), Concentrações de Efeito Observado (CEO) e Concentrações de Efeito/Inibição a 50% dos Organismos (CE₅₀/CI₅₀) para as três espécies expostas as cinco substâncias de estudo. n.d. = não determinado, 100%. A exposição de *M. quinquiesperforata* ao SG gerou apenas um valor de CE10, sinalizado por asterisco (*).

	<i>Mellita quinquiesperforata</i>			<i>Perna perna</i> (embriolarval)			<i>Nitokra sp.</i>		
	CENO (mg/L)	CEO (mg/L)	CE ₁₀ /CE ₅₀ (mg/L)	CENO (mg/L)	CEO (mg/L)	CE ₅₀ (mg/L)	CENO (mg/L)	CEO (mg/L)	CI ₅₀ (mg/L)
Gluconato de Sódio	1,23	3,7	4,31 (1,94 – 9,61) *	< 1,23	1,23	1,48 (0,19-11,35)	33,3	100	40,5 (15–109,2)
ZnAl-LDH	<0,41	0,41	5,77 (3,75 – 8,86)	< 1,23	1,23	0,26 (0,22–0,32)	11,1	33,3	15,04 (9,05–25,0)
ZnAl-LDH-SG	<0,41	0,41	1,38 (1,08 – 1,76)	< 1,23	1,23	n.d.	< 1,23	1,23	0,94 (0,32–2,81)
NO₂	1,23	3,7	3,15 (1,89 – 5,25)	33,3	100	19,52 (15,58 - 24,47)	33,3	100	41,54 (19,85-86,94)
ZnAl-LDH-NO₂	0,41	1,23	0,86 (0,43 – 1,73)	<1,23	1,23	n.d.	11,1	33,3	18,08 (9,16-35,68)

4. Discussão

Os resultados apresentados demonstram uma maior sensibilidade dos organismos aos compostos nanoestruturados (ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂) quando comparados a sua forma livre, diferindo dos estudos publicados por Martins *et al.* (2017; 2022) e Gutner-Hoch *et al.* (2018; 2019), onde o ingrediente ativo livre se mostra mais tóxico do que sua forma nanoestruturada para espécies de ambiente temperado, sob diferentes condições físico-químicas. Por meio destes resultados, observamos então, uma maior sensibilidade da fase embrionária do bivalve *Perna perna*, seguido da fase embrionária do equinodermo *M. quinquiesperforata*, diferindo em uma ordem de grandeza.

Segundo a classificação da Comissão Européia adaptada por Blaise *et al.* (2008) para nanomateriais e utilizando os valores de CE₅₀ e CI₅₀ o composto ZnAl-LDH-SG seria considerado muito tóxico para *Nitokra sp.*, ZnAl-LDH para *P. Perna* e ZnAl-LDH-NO₂ para *Mellita quinquiesperforata*. Os tóxicos, para *M. quinquiesperforata*, seriam ZnAl-LDH-SG, ZnAl-LDH e NO₂ e SG para *P. perna*. O SG também seria tóxico para *M. quinquiesperforata*, mas levando em consideração o valor de CEO apresentado para a espécie, já que não foi possível obter um valor de CE₅₀. Isso também acontece com os compostos nanoestruturados ZnAl-LSH-SG e ZnAl-LDH-NO₂ na exposição com *P. perna*. Os compostos considerados nocivos são NO₂ para *P. perna* e NO₂, SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-NO₂ para *Nitokra sp.*, como podemos observar na Tabela 2.

Tabela 2 Tabela qualitativa utilizando conceitos adaptados por Blaise *et al.* (2008) a respeito da toxicidade de nanomateriais. A cor verde clara representa materiais nocivos (10-100 mg/L), o amarelo representa compostos tóxicos (1-10 mg/L) e o vermelho muito tóxicos (0,1-1 mg/L). Em todas as classificações foram utilizados os valores de CE₅₀ ou CI₅₀, exceto para SG em *M. quinquesperforata* e ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂ em *P. perna*, que foram utilizados os valores de CEO.

	NO ₂	SG	ZnAl-LDH	ZnAl-LDH-NO ₂	ZnAl-LDH-SG
<i>Mellita quinquesperforata</i>	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho	Amarelo
<i>Perna perna</i>	Verde Claro	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Amarelo
<i>Nitokra sp.</i>	Verde Claro	Verde Claro	Verde Claro	Verde Claro	Vermelho

Outro estudo realizado por Beverari (2023), mostrou a mesma tendência com o ouriço do mar *Echinometra lucunter*, onde os mesmos anticorrosivos foram analisados e foi observada maior toxicidade dos compostos nanoestruturados quando comparados à suas partes livres.

Porém, a mesma tendência não foi observada em outro estudo realizado pelo nosso grupo, analisando a toxicidade do anticorrosivo 2-mercapbenzotiazol (MBT) livre e nanoestruturado. Estágios embrionários de *E. lucunter* e fêmeas ovadas de *Nitokra sp.* foram expostos a estes compostos, onde foi observada uma diminuição da toxicidade nos ensaios realizados com o composto nanoestruturado. Este estudo também analisou dois diferentes tipos de nanoestruturas, MgAl-LDH e ZnAl-LDH. A nanoestrutura contendo magnésio foi menos tóxica a estágios embrionários de *E. lucunter* comparadas às que continham zinco (Santos, 2023).

Os LDH, como os diversos nanomateriais manufaturados, tem a tendência de formar aglomerados em ambientes aquosos. O tamanho dessas nanoestruturas aumenta no

processo de aglomeração, podendo alterar sua dispersão na água, afetando, então, sua toxicidade (Yu *et al.*, 2023). Outro fator que afeta a toxicidade da nanoestrutura e a sua estabilidade, que diminui, por sua vez, o potencial de repulsão entre as nanopartículas, formando aglomerados, é a presença de sais solúveis na água e a baixa capacidade de adsorção do nitrato presente nas nanoestruturas “vazias” (Carneiro *et al.*, 2023).

Um estudo conduzido por Yu *et al.* (2023) analisou alguns fatores que podem alterar a toxicidade de ZnAl-LDH. Neste estudo foi verificado que o potencial zeta do ZnAl-LDH aumentou em um teste de 96 horas em meio aquoso, aumentando sua estabilidade, porém diminuindo significativamente o diâmetro hidrodinâmico da nanoestrutura em 24 horas, aumentando sua sedimentação. Com o comportamento de sedimentação, também foi observada uma diminuição na concentração dos metais presentes na nanoestrutura, indicando uma liberação destes compostos para o meio. Outro ponto importante analisado, que também aumenta a toxicidade do ZnAl-LDH, é que sua estrutura, durante a exposição, tendeu a ser positiva, o que aumenta a interação com as células dos organismos que estão no meio. Essa ação de interação dos compostos com os organismos pode explicar os resultados obtidos nos três testes crônicos, impedindo as células de se dividirem, levando ao desenvolvimento embrionário e, no ensaio com copépodos, impedindo a liberação dos ovos, diminuindo, então, a taxa de fecundidade.

Alguns estudos que analisam a toxicidade de nanopartículas metálicas em organismos marinhos de diferentes níveis tróficos, observaram uma maior toxicidade de nanopartículas de zinco (ZnO) quando comparadas a outras nanopartículas metálicas, como dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de cério (CeO₂) (Fairbairn *et al.*, 2011; Heinlaan *et al.*, 2008). Essa maior toxicidade pode estar ligada com a solubilização e maior disponibilidade dos íons de zinco, o que também explicaria uma maior toxicidade dos

compostos nanoestruturados observada neste estudo (Novell-Leruth *et al.*, 2020).

Segundo estudos conduzidos sobre a toxicidade de zinco às espécies utilizadas neste projeto, o valor de CE_{50} para *P. perna* é de 0,06 mg/L (Del Cielo *et al.*, 2013), para *M. quinquiesperforata* é de 0,22 mg/L (Laitano *et al.*, 2008) e para *Nitokra* sp. é de 0,64 mg/L (Artal, 2013). Essa sensibilidade ao metal componente da nanoestrutura corrobora a maior toxicidade observada nas exposições às nanoestruturas quando comparamos aos ICs em sua forma livre. Esse comportamento acontece devido a concentração de zinco disponível na água, a partir da nanoestrutura, ser de uma ordem de grandeza superior nas maiores concentrações de ZnAl-LDH, ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂, em condições de ambiente temperado (resultados ainda não publicados, dados em processamento pela equipe do projeto NANOGREEN).

Um estudo foi conduzido por Wang *et al.* (2014) comparando a sensibilidade de diferentes organismos de ambientes temperados e tropicais a 11 diferentes compostos, incluindo o zinco. Quando comparados, observou-se uma maior sensibilidade dos organismos tropicais expostos ao zinco, onde os grupos mais afetados foram os moluscos e crustáceos. Estes resultados, e a concentração de zinco na água através da liberação da nanoestrutura sendo maior que os valores de CE_{50} para as espécies utilizadas, ajudam a compreender a diferença de padrão nos resultados obtidos entre organismos temperados e tropicais.

Como os parâmetros físico-químicos da água também podem interferir no comportamento das nanoestruturas foi realizado um estudo da liberação dos ICs, e dos metais presentes na nanoestrutura, simulando condições de ambiente tropical. Para essa avaliação, foi realizada a análise da presença de zinco, alumínio e os inibidores de corrosão na água em diferentes tempos. Os resultados ainda estão em análise e após isso serão

comparados às concentrações obtidas em condições de ambiente temperado.

A mudança de pH, por exemplo, também pode aumentar a disponibilidade de íons metálicos presentes nos nanomateriais, aumentando seu efeito ecotoxicológico, assim como a presença de matéria orgânica, que não só aumenta o potencial de aglomeração das nanopartículas, como também aumenta o efeito tóxico delas (Yu *et al.*, 2023). Esse efeito pode ter ocorrido, principalmente no ensaio com os copépodos, onde foi ofertado 50 µL de alimento (levedura homogeneizada em água) em cada réplica no início do teste.

A liberação dos IC da nanoestrutura se dá através de trocas aniônicas e mudanças no pH, onde o ânion presente na parte interna (e.g. nitrito) “trocará de lugar” com outro na parte externa (e.g. cloretos). Como as mudanças de temperatura, pH, salinidade e presença de matéria orgânica, podem alterar o comportamento das nanoestruturas, assim como a forma de liberação do IC ou dos metais associados às LDH, isso pode afetar, também, a sua toxicidade (Martins *et al.*, 2017). Nesse caso, o menor pH, a menor salinidade, e a presença de matéria orgânica nas câmaras-teste poderiam ajudar a explicar a toxicidade observada nos testes com *Nitokra* sp.

Os dados a respeito da toxicidade destes compostos em organismos marinhos ainda são muito escassos. Quando comparamos os resultados obtidos neste trabalho com outros anticorrosivos nanoestruturados estudados em espécies marinhas de ambiente temperado, podemos observar que as espécies expostas pelo nosso grupo se mostraram mais sensíveis (Martins *et al.*, 2017; 2022; Gutner-Hoch *et al.*, 2018; 2019).

No trabalho de Martins *et al.* (2017) realizado com o anticorrosivo MBT em suas formas livres e nanoestruturadas, expondo adultos do bivalve *Ruditapes philippinarum*, e no trabalho feito por Santos (2023) com os mesmos compostos, mas expondo o cópepodo *Nitokra* sp. e o ouriço do mar *E. lucunter*, não foi observada essa mesma tendência, tendo a

nanoestruturação diminuído a toxicidade do composto. Porém, apesar de mostrarem a mesma tendência nas respostas da exposição, os organismos de ambiente tropical se mostraram muito mais sensíveis que os expostos pelo primeiro grupo citado, como apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Dados retirados do estudo realizado por Santos 2023 e Martins *et al.*, 2017 acerca de valores de CE₂₀ e CE₅₀ do anticorrosivo MBT nanoestruturado e suas partes livres. O asterisco (*) representa valor de CE₂₀ quando não foi possível obter o de CE₅₀.

	<i>E. lucunter</i> CE ₅₀ (mg/L)	<i>Nitokra sp.</i> CI ₅₀ (mg/L)	<i>R. philippinarum</i> CE ₂₀ */CE ₅₀ (mg/L)
MBT	0,020 (0,006- 0,065)	0,227 (0,002–18,41)	22.1 (13,2-31,83)
ZnAl-LDH	0,107 (0,037-0,305)	15,04 (9,054 – 24,99)	90,6 (66,20-142,35)*
ZnAl-LDH-MBT	0,054 (0,029-0,098)	0,519 (0,356– 0,758)	50,4 (42,78-60,14)

Apesar de todas as espécies testadas neste trabalho terem se mostrado sensíveis, quando comparadas entre si, há maior sensibilidade dos embriões do bivalve *P. perna*, que apresentaram efeitos significativos a partir da primeira concentração testada e apresenta os menos valores de CE₅₀, seguido dos embriões do equinodermo *Echinometra lucunter*, que apresentaram concentrações de efeito na mesma ordem de grandeza, exceto para a exposição ao NO₂, como podemos observar na Tabela 4. Contudo, podemos observar uma mesma tendência entre todas as espécies testadas, onde o composto nanoestruturado se mostrou mais tóxico do que suas formas livres.

Tabela 4 Dados obtidos neste trabalho e estudo realizado por Beverari 2023, comparando os valores de CE₅₀. O asterisco indica o valor de CE₁₀ quando não foi possível obter valor de CE₅₀. n.d. indica valores não determinados.

	<i>E. lucunter</i> CE ₅₀ (mg/L)	<i>Nitokra sp.</i> CI ₅₀ (mg/L)	<i>M. quinquesperforata</i> CE ₁₀ */CE ₅₀ (mg/L)	<i>P. perna</i> CE ₅₀ (mg/L)
SG	1,21 (0,56–0,28)	40,46 (15–109,2)	4,31 (1,94 – 9,61) *	3,73 (2,26–6,16)
ZnAl-LDH	6,24 (5,31–7,33)	15,04 (9,054 –24,99)	5,76 (3,75–8,85)	0,26 (0,21–0,31)
ZnAl-LDH-SG	0,67 (0,51–0,9)	0,94 (0,31–2,81)	1,37 (1,07–1,75)	n.d.
NO₂	n.d.	41,54 (19,85-86,94)	3,15 (1,89–5,25)	19,52 (15,58-24,47)
ZnAl-LDH-NO₂	0,41 (0,37–0,44)	18,08 (9,16-35,68)	0,86 (0,43–1,73)	n.d.

Quando comparamos as duas Tabelas acima (3 e 4) podemos observar uma maior sensibilidade dos organismos de ambiente tropical de maneira geral, com destaque para *E. lucunter* exposto ao MBT nanoestruturado e suas formas livres, apresentando os menores valores de CE₅₀. Com os resultados obtidos neste trabalho podemos classificar em ordem de composto mais tóxico para as espécies neotropicais para o menos tóxico, da seguinte forma: ZnAl-LDH-NO₂ > ZnAl-LDH-SG > ZnAl-LDH > NO₂ > SG.

Há a necessidade de se entender melhor a diferença do comportamento das nanoestruturas em organismos temperados e tropicais, analisando a liberação dos compostos da nanoestrutura em diferentes conformidades, devido à diferença nas toxicidades observadas neste estudo, com organismos tropicais, e demais estudos com organismos temperados.

Este trabalho tem grande relevância científica, sendo um dos primeiros a apresentar resultados sobre esses compostos para organismos marinhos tropicais e também ajudar a gerar produtos mais seguros para o ambiente antes de serem colocados no mercado.

5. Conclusão

Neste estudo, foi observada uma maior toxicidade dos compostos nanoestruturados quando comparados com suas formas livres (SG; NO₂; LDH), para as três espécies analisadas, aceitando a hipótese nula, resultado contrário ao padrão encontrado para organismos de regiões temperadas.

Com isso, podemos destacar que para *Nitokra* sp. tivemos o ZnAl-LDH-SG como o composto mais tóxico ao qual foram expostos, apresentando um valor de CE₅₀ duas ordens de grandeza menor do que aos demais compostos; para *Perna perna* os dois bio-ICs nanoestruturados (ZnAl-LDH-NO₂ e ZnAl-LDH-SG) foram os compostos mais tóxicos, já que não houve desenvolvimento em nenhuma concentração aos quais os organismos foram expostos; e para *Mellita quinquesperforata* tivemos o ZnAl-LDH-NO₂ como o composto de exposição mais tóxico, apresentando um valor de CE₅₀ uma ordem de grandeza abaixo do que os valores de CE₅₀ para os demais compostos.

Este projeto apresenta uma importante contribuição sobre os efeitos desses nanomateriais inovadores em espécies de ambiente tropical. Os resultados, apontando uma maior toxicidade para os compostos nanoestruturados, diferente do observado em organismos de ambiente temperado, evidencia a necessidade de realizar estudos comparativos com organismos dos diferentes hemisférios. Esses estudos devem incluir não só os ensaios de toxicidade, mas também estudos sobre o comportamento das nanoestruturas e liberação dos componentes delas em diferentes condições ambientais. Esses resultados, assim como os do presente projeto, ajudarão o desenvolvimento de compostos eficazes e sustentáveis, apresentando menos riscos ambientais.

Referências Bibliográficas

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2016). Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com embriões de bivalves (Mollusca -Bivalvae), 2016. Norma ABNT NBR 16456:2016.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2020). Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma ABNT NBR 15350:2020. 31 p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2021). Ecotoxicologia aquática — Método de ensaio com copépodos marinhos (Copepoda, Crustacea). Norma ABNT NBR 16723:2021. 32 p.
- ARTAL, M. C. (2013). Aplicação de teste de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra* sp. na avaliação de corantes.
- Avelelas, F., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Malheiro, E., Soares, A. M., ... & Tedim, J. (2017). Efficacy and ecotoxicity of novel anti-fouling nanomaterials in target and non-target marine species. *Marine biotechnology*, 19, 164-174.
- Beverari, I. (2023). Avaliação ecotoxicológica dos inibidores de corrosão biológicos: Gluconato de Sódio (SG) e Nitrito de Sódio (NO₂), em suas formas livres e nanoencapsuladas, sobre embriões de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*).
- Blaise, C., Gagné, F., Ferard, J. F., & Eullaffroy, P. (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 23(5), 591-598.

- Campos, B.G.; Silva, M.B.M.P.; Avelelas, F.; Maia, F.; Loureiro, S.; Perina, F.; Abessa, D.M.S.; Martins, R. 2022. Toxicity of innovative antifouling additives on an early life stage of the oyster *Crassostrea gigas*: short and long-term exposure effects. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17842-3>
- Canesi L. & Corsi, I., 2016. Effects of nanomaterials on marine invertebrates. *Science of the Total Environment*, 565, 933–940.
- Carneiro, D., Damasceno, É. P., Ferreira, V., Charlie-Silva, I., Tedim, J., Maia, F., ... & Pavlaki, M. D. (2023). Zn-Al layered double hydroxides induce embryo malformations and impair locomotion behavior in *Danio rerio*. *NanoImpact*, 30, 100457.
- ChemSafetyPro. 2016. How to Calculate Predicted No-Effect Concentration (PNEC). Available at: [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_\(PNEC\).html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/How_to_Calculate_Predicted_No-Effect_Concentration_(PNEC).html) (accessed on April 4th, 2022).
- Del Cielo, C. C., Malgarin, J., & Resgalla Jr, C. (2013). Revisão dos ensaios crônicos de curta duração com embriões do mexilhão *Perna perna* (L.). *Ecotoxicol Environ Contam*, 8(2), 37-43.
- Duanis-Assaf, D., Shlar, I., Galsurker, O., Davydov, O., Maurer, D., Feygenberg, O., ... & Alkan, N. (2022). Nano-clay, layered-double hydroxide (LDH), improves the efficacy of double-stranded RNA in controlling postharvest decay. *Postharvest Biology and Technology*, 193, 112051.
- EC, 2011. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial(2011/696/EU) - The European Commission. *Official Journal of the European Union*, L275, 38–40.

ECHA – European Chemicals Agency. 2008. ECHA guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. Available at: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r10_en.pdf/bb902be7-a503-4ab7-9036-d866b8ddce69 (accessed on April 4th, 2022).

ECHA – European Chemicals Agency. 2016. ECHA guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.16: Environmental Exposure Estimation. Available at: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r16_en.pdf/b9f0f406-ff5f-4315-908e-e5f83115d6af (accessed on April 4th 2022).

FAIRBAIRN, Elise A., et al. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *Journal of hazardous materials*, 2011, 192.3: 1565-1571.

Figueira R.B., 2020. Hybrid sol-gel coatings for corrosion mitigation: A critical review. *Polymers*, 12, 9–12.

Figueiredo, J., Oliveira, T., Ferreira, V., Sushkova, A., Silva, S., Carneiro, D., ... & Martins, R. (2019). Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. *Environmental Science: Nano*, 6(5), 1418-1429.

Fink, J. K., 2012. Corrosion Inhibitors. *In*: J.K. Fink (ed.), *Petroleum Engineer's Guide to Oil Field Chemicals and Fluids*, Chapter 6. Gulf Professional Publishing is an imprint of Elsevier, 217-252

- GHALEHNO, Mohammad Dahmardeh; KORD, Behzad; ADLNASAB, Laleh. A comparative study on effects of layered double hydroxide (LDH) and halloysite nanotube (HNT) on the physical, mechanical and dynamic mechanical properties of reed flour/polyvinyl chloride composites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 2023, 36.3: 1154-1174.
- Gutner-Hoch, E., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Soares, A. M., Loureiro, S., ... & Benayahu, Y. (2018). Antimicrofouling efficacy of innovative inorganic nanomaterials loaded with booster biocides. *Journal of Marine Science and Engineering*, 6(1), 6.
- Gutner-Hoch, E., Martins, R., Maia, F., Oliveira, T., Shpigel, M., Weis, M., ... & Benayahu, Y. (2019). Toxicity of engineered micro-and nanomaterials with antifouling properties to the brine shrimp *Artemia salina* and embryonic stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Pollution*, 251, 530-537.
- Hamadi, L., Mansouri, S., Oulmi, K., & Kareche, A. (2018). The use of amino acids as corrosion inhibitors for metals: A review. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27(4), 1157-1165.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., & Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), 1308-1316.
- Laitano, K. S., Gonçalves, C., & Resgalla Jr, C. (2008). Viabilidade do uso da bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* como organismo teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol*, 3, 9-14.

- LEAD, J. R. (2008). NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825-1851.
- Li, J. H., Zhao, B., Hu, J., Zhang, H., Dong, S. G., Du, R. G., & Lin, C. J. (2015). Corrosion inhibition effect of D-sodium gluconate on reinforcing steel in chloride-contaminated simulated concrete pore solution. *Int J Electrochem Sci*, 10, 956-968.
- Liao, C., Kim, U. J., & Kannan, K. (2018). A review of environmental occurrence, fate, exposure, and toxicity of benzothiazoles. *Environmental science & technology*, 52(9), 5007-5026.
- Loukil N. & Feki M., 2020. Review – Zn-Mn Electrodeposition: A Literature Review. *Journal of The Electrochemical Society*, 167, 022503.
- Maia, F., Tedim, J., Lisenkov, A. D., Salak, A. N., Zheludkevich, M. L., & Ferreira, M. G. (2012). Silica nanocontainers for active corrosion protection. *Nanoscale*, 4(4), 1287-1298.
- Martins, R., Oliveira, T., Santos, C., Kuznetsova, A., Ferreira, V., Avelas, F., ... & Loureiro, S. (2017). Effects of a novel anticorrosion engineered nanomaterial on the bivalve *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science: Nano*, 4(5), 1064-1076.
- Martins, R., Figueiredo, J., Sushkova, A., Wilhelm, M., Tedim, J., & Loureiro, S. (2022). "Smart" nanosensors for early detection of corrosion: Environmental behavior and effects on marine organisms. *Environmental Pollution*, 302, 118973.

- Mello, L.C.; Fonseca, T.G.; Abessa, D.M.S. 2020. Ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquiesperforata*. Marine Pollution. Bulletin, 159. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111493>
- Moermond, C.T.A.; Kase, R.; Korkaric, M.; Ågerstrand, M. 2016. CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 35(5): 1297-1309.
- Moore, M. N., Depledge, M. H., Readman, J. W., & Leonard, D. P. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 552(1-2), 247-268.
- Narchi, W., & Galvão-Bueno, M. S. (1997). Anatomia funcional de *Perna perna* (Linné) (bivalvia, Mytilidae). Revista Brasileira de Zoologia, 14, 135-168.
- Novell-Leruth, G., Pérez-Sánchez, G., Galvão, T. L., Boiba, D., Poznyak, S., Carneiro, J., ... & Gomes, J. R. (2020). Unveiling the local structure of 2-mercaptobenzothiazole intercalated in (Zn₂Al) layered double hydroxides. Applied Clay Science, 198, 105842.
- Ou, H. H., & Hsieh, L. H. C. (2016). A synergistic effect of sodium gluconate and 2-phosphonobutane-1, 2, 4-tricarboxylic acid on the inhibition of CaCO₃ scaling formation. Powder Technology, 302, 160-167.
- Palou, R. M., Olivares-Xomelt, O., & Likhanova, N. V. (2014). Environmentally friendly corrosion inhibitors. Developments in corrosion protection, 431-465.

- Posthuma, L., van Gils, J., Zijp, M. C., van De Meent, D., & de Zwart, D. (2019). Species sensitivity distributions for use in environmental protection, assessment, and management of aquatic ecosystems for 12 386 chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 905-917.
- Poznyak, S. K., Tedim, J., Rodrigues, L. M., Salak, A. N., Zheludkevich, M. L., Dick, L. F. P., & Ferreira, M. G. S. (2009). Novel inorganic host layered double hydroxides intercalated with guest organic inhibitors for anticorrosion applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1(10), 2353-2362.
- Preston, B. L. (2002). Indirect effects in aquatic ecotoxicology: implications for ecological risk assessment. *Environmental Management*, 29(3), 311-323.
- Radwan, I. T., Baz, M. M., Khater, H., Alkhaibari, A. M., & Selim, A. M. (2022). Mg-LDH nanoclays intercalated fennel and green tea active ingredient: field and laboratory evaluation of insecticidal activities against *Culex pipiens* and their non-target organisms. *Molecules*, 27(8), 2424.
- RCEP, 2008. Novel Materials in the Environment: The case of nanotechnology. *Royal Commission on Environmental Pollution - Twenty-seventh Report*. Cm 7468, London, United Kingdom, Stationery Office Limited, 147 p.
- Santos, J.V.N.; Martins, R.; Fontes, M.K.; Campos, B.G.; Silva, M.B.M.P.; Maia, F.; Abessa, D.M.S.; Perina, F.C. 2020. Shaping the future towards safer and simultaneously more efficient anti-fouling additives: nanostructured and conventional DCOIT as a case study. *Applied Sciences*, 10(23), 8579; <https://doi.org/10.3390/app10238579>
- Santos, J. V. N. D. (2023). Avaliação da ecotoxicidade crônica de 2-mercaptobenzotiazol livre e nanoestruturado em hidróxidos duplos lamelares.

- Serdaroğlu, G., Kaya, S., & Tour, R. (2020). Eco-friendly sodium gluconate and trisodium citrate inhibitors for low carbon steel in simulated cooling water system: Theoretical study and molecular dynamic simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 319, 114108.
- Shen, M., Furman, A., & Kharshan, R. (2015, March). investigation of Bio-based Aromatic Acids as Corrosion Inhibitor. In *NACE CORROSION* (pp. NACE-2015). NACE.
- Singh, W. P., & Bockris, J. O. (1996, March). Toxicity issues of organic corrosion inhibitors: applications of QSAR model. In *Nace Corrosion* (pp. NACE-96225). NACE.
- Sørensen, P. A., Kiil, S., Dam-Johansen, K., & Weinell, C. E. (2009). Anticorrosive coatings: a review. *Journal of coatings technology and research*, 6, 135-176.
- Tayemeh, M. B., Esmailbeigi, M., Shirdel, I., Joo, H. S., Johari, S. A., Banan, A., ... & Tabarrok, M. (2020). Perturbation of fatty acid composition, pigments, and growth indices of *Chlorella vulgaris* in response to silver ions and nanoparticles: A new holistic understanding of hidden ecotoxicological aspect of pollutants. *Chemosphere*, 238, 124576.
- Tedim, J., Poznyak, S. K., Kuznetsova, A., Raps, D., Hack, T., Zheludkevich, M. L., & Ferreira, M. G. S. (2010). Enhancement of active corrosion protection via combination of inhibitor-loaded nanocontainers. *ACS applied materials & interfaces*, 2(5), 1528-1535.
- Verma, C., Kumar, A. M., Mazumder, M. A. J., & Quraishi, M. A. (2018). Chitosan-Based Green and Sustainable Corrosion Inhibitors for Carbon Steel. *Chitin-Chitosan: Myriad Functionalities in Science and Technology*, 143.

- Verma, C., Ebenso, E. E., & Quraishi, M. A. (2020). Molecular structural aspects of organic corrosion inhibitors: Influence of–CN and–NO₂ substituents on designing of potential corrosion inhibitors for aqueous media. *Journal of Molecular Liquids*, 316, 113874.
- Yu, L., Wang, Z., & Wang, D. G. (2023). Factors affecting the toxicity and oxidative stress of layered double hydroxide-based nanomaterials in freshwater algae. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(22), 63109-63120.
- Wang, Z., Kwok, K. W., Lui, G. C., Zhou, G. J., Lee, J. S., Lam, M. H., & Leung, K. M. (2014). The difference between temperate and tropical saltwater species' acute sensitivity to chemicals is relatively small. *Chemosphere*, 105, 31-43.
- Zagatto, P. A. (2015). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Seminário Sobre Ecotoxicologia Aquática.
- Zheludkevich, M. L., Poznyak, S. K., Rodrigues, L. M., Raps, D., Hack, T., Dick, L. F., ... & Ferreira, M. G. S. (2010). Active protection coatings with layered double hydroxide nanocontainers of corrosion inhibitor. *Corrosion Science*, 52(2), 602-611.
- Zheludkevich M., et al., TATA Steel., 2013. Patent number: WO 2013083293 A1. Application number: PCT/EP2012/005102. Publication date: Jun 13, 2013.

APÊNDICE I

1. Parâmetros físico-químicos

Tabela 5 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com a fase embrionária de bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* expostas a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.

Concentração (mg/L)	SG			ZnAl-LDH			ZnAl-LDH-SG		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
0,41	8,26	35	6,43	8,49	35	6,71	8,48	35	6,72
1,23	8,29	35	6,8	8,44	35	6,83	8,56	35	6,84
3,7	8,29	35	6,78	8,47	35	6,75	8,5	35	6,67
11,1	8,13	35	6,62	8,34	35	6,81	8,47	35	6,65
33,3	7,98	35	6,73	8,26	35	6,59	8,28	35	6,7
Controle	8,4	35	6,44						

Tabela 6 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referentes ao experimento com a fase embrionária de bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata* expostas a NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂.

NO ₂ Concentração (mg/L)	INICIAL			FINAL			Controle		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
1,23	7,85	35	7,69	8,40	35	6,59	INICIAL		
3,7	7,88	35	7,54	8,28	35	6,56	6,9	35	7,26
11,1	7,86	35	7,99	8,26	35	6,52	FINAL		
33,3	7,87	35	7,52	8,32	35	6,56	8,10	35	7,23
100	7,85	35	7,41	8,31	36	6,50			

ZnAl-LDH-NO ₂ Concentração (mg/L)	INICIAL			FINAL		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
0,137	7,87	35	7,36	8,37	35	6,53
0,41	7,91	35	7,89	8,41	35	6,44
1,23	7,93	35	7,41	8,38	35	6,27
3,7	7,93	35	7,30	8,21	35	6,37
11,1	7,92	35	7,34	8,31	35	6,53

Tabela 7 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com desenvolvimento embrionário de mexilhões *Perna perna* expostos a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.

Concentração (mg/L)	SG			ZnAl-LDH			ZnAl-LDH-SG		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
1,23	8,02	35	6,21	8,08	35	6,09	8,04	35	5,62
100	8,03	35	6,51	8,04	35	5,73	8,01	35	5,79
Controle	8,14	35	5,15						

Tabela 8 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com desenvolvimento embrionário de mexilhões *Perna perna* expostos a NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂.

INICIAL Concentração (mg/L)	NO ₂			ZnAl-LDH-NO ₂		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
1,23	8,10	35	7,43	8,15	35	7,30
3,7	8,30	35	7,43	7,90	35	7,40
11,1	8,32	35	7,44	8,50	35	7,28
33,3	8,57	35	7,42	8,40	35	7,52
100	8,57	35	7,26	8,57	35	7,41
Controle	7,80	35	7,27			

FINAL Concentração (mg/L)	NO ₂			ZnAl-LDH-NO ₂		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
1,23	8,76	35	6,70	8,91	35	7,60
3,7	8,85	35	6,80	9,05	35	7,25
11,1	8,48	35	6,67	9,06	35	7,20
33,3	8,65	35	6,40	8,96	35	7,10
100	8,83	35	6,70	8,85	35	6,95
Controle	8,55	35	7,40			

Tabela 9 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referente ao experimento sobre a taxa de fecundidade do copépodo estuarino *Nitokra* sp. expostos a SG, ZnAl-LDH e ZnAl-LDH-SG.

INICIAL	SG		ZnAl-LDH		ZnAl-LDH-SG		Controle	
	pH	salinidade	pH	salinidade	pH	salinidade	pH	salinidade
Concentração (mg/L)								
1,23	7,75	17	7,9	17	7,82	17	7,54	17
100	7,76	17	7,58	17	7,83	17		

FINAL	SG		ZnAl-LDH		ZnAl-LDH-SG		Controle	
	pH	salinidade	pH	salinidade	pH	salinidade	pH	salinidade
Concentração (mg/L)								
1,23	7,72	19	7,81	19	7,61	19	7,47	19
100	7,62	19	7,5	19	7,56	19		

Tabela 10 Parâmetros físico-químicos iniciais e finais referente ao experimento sobre a taxa de fecundidade do copépodo estuarino *Nitokra* sp. expostos a NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂.

INICIAL	NO ₂			ZnAl-LDH-NO ₂		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
Concentração (mg/L)						
1,23	7,68	15	6,57	7,88	19	6,09
3,7	7,74	15	6,57	7,94	19	6,50
11,1	7,69	16	6,41	7,98	19	6,14
33,3	7,85	16	6,58	7,96	17	6,11
100	7,78	16	6,58	7,80	16	6,18
Controle	7,70	15	6,60			

FINAL Concentração (mg/L)	NO ₂			ZnAl-LDH-NO ₂		
	pH	salinidade	OD (p.p.m.)	pH	salinidade	OD (p.p.m.)
1,23	7,56	15	6,30	7,64	19	6,60
3,7	7,62	15	6,50	7,62	17	6,20
11,1	7,67	15	6,60	7,60	19	6,30
33,3	7,73	15	6,30	7,66	17	6,20
100	7,74	15	6,20	7,72	15	6,10
Controle	7,60	15	6,20			