

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de **22/12/2025**.

**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.

**SÃO VICENTE – SP
2023**

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 manufaturados (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 (NO_2), nas formas livres e nanoestruturadas (LDH-SG; LDH- NO_2), assim como o nanomaterial base (LDH), utilizando espécies marinhas neotropicais. Foram feitos ensaios de toxicidade crônica, para avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento embrionar 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- NO_2 > ZnAl-LDH > SG e NO_2 . 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

Metalic 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 (NO_2) in their free and nanostructured forms (LDH-SG; LDH- NO_2), 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- NO_2 > ZnAl-LDH > SG and NO_2 . 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 (CE₅₀/CI₅₀) 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 *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. quinquiesperforata* e ZnAl-LDH-SG e ZnAl-LDH-NO₂ em *P. perna*, que foram utilizados os valores de CEO..... 35

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. 39

Tabela 4 Dados obtidos neste trabalho e estudo realizado por Beverari 2023, comparando os valores de CE₅₀. O asterisco indica o valor de CE₂₅ quando não foi possível obter valor de CE₅₀. n.d. indica valores não determinados..... 40

Tabela 5 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com a fase embrionária de bolacha-do-mar *Mellita quinquiesperforata* 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 *Mellita quinquiesperforata* expostas a NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂. 51

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. 52

Tabela 8 Parâmetros físico-químicos iniciais referentes ao experimento com desenvolvimento embrionário de mexilhões *Perna perna* expostos a NO₂ e ZnAl-LDH-NO₂..... 52

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. 53

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..... 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 sido 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; Serdaroğlu *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, absorbância 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 (NO_2) 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 quinquesperforata*

Bolachas-do-mar são equinodermos da espécie *Mellita quinquesperforata* (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 arrebentação. 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 quinquiesperforata (bolacha-do-mar) e *Perna perna* (mexilhão) e fêmeas ovadas do copépodo *Nitokra* sp. expostos aos compostos previamente citados.

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 quinquiesperforata* 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). Antimacrofouling 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 Commision on Enviromental 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., & Touri, 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.