

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

CAMILA PRIETO MARTINS

**“AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO INIBIDOR DE CORROSÃO
2-MERCAPTOBENZOTIAZOL (MBT), EM SUA FORMA LIVRE E
NANOENCAPSULADA (SiNC), SOBRE EMBRIÕES DE *Perna perna* (LINNAEUS
1758)”**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

CAMILA PRIETO MARTINS

**“AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO INIBIDOR DE CORROSÃO
2-MERCAPTOBENZOTIAZOL (MBT), EM SUA FORMA LIVRE E
NANOENCAPSULADA (SiNC), SOBRE EMBRIÕES DE *Perna perna* (LINNAEUS
1758)”**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Biologia Marinha.

Orientador(a): Caio Cesar-Ribeiro

Coorientador(a): Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente - SP
2024

P949a	Prieto, Camila Martins Avaliação ecotoxicológica do inibidor de corrosão 2-mercaptobenzotiazol (MBT), em sua forma livre e nanoencapsulada (SiNC), sobre embriões de Perna perna (Linnaeus 1758) / Camila Martins Prieto. -- São Vicente, 2024 35 p. : il., tabs., fotos, mapas Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Caio Cesar-Ribeiro Coorientador: Denis Moledo de Souza Abessa 1. Nanomateriais. 2. Embriolarval. 3. Anticorrosivos. I. Título.
-------	--

AGRADECIMENTOS

Com a finalização deste projeto, extremamente marcante e relevante para a minha formação, tenho muito a agradecer. Muitas pessoas foram responsáveis para que eu seja quem sou hoje, portanto, agradeço primeiro à minha família. Aos meus pais e ao meu irmão, que sempre estiveram ao meu lado, dando apoio e suporte antes e durante minha graduação. Graças a vocês, eu amo dar aula, o cheirinho da média saindo do forno, praias e minha casa; À minha tia Geny, que me ensinou o que é amor, estando sempre comigo quando eu amo, e eu realmente amo o que faço; E à minha avó Glória, tenho certeza que estamos sempre juntas.

Agradeço às minhas amigas de escola, em especial à Luiza, que conheço por quase metade da minha vida. Amo crescer com vocês, obrigada por fazerem parte de mim. Agradeço muito por tudo que pude viver em meu campus. A todos os docentes, que me inspiraram e apoiaram; À turma XX, que me proporcionou amizades incríveis, essenciais em todas etapas da graduação. Todas as atividades são muito mais divertidas com vocês! Aos órgãos estudantis, como a SEDUCA e o Cursinho Caiçara, que me trouxeram a sensação de pertencimento ao CLP. Espero ter contribuído pelo menos um pouquinho em toda essa história; E agradeço por ter me apresentado meu melhor amigo, que posso chamar de namorado, que, apesar de ser muito cabeça dura, sempre me lembra de me divertir.

Com muito carinho, agradeço meus orientadores. Ao Caio, serei sempre grata por me apresentar à minha vocação, muito do que sei veio de você. Obrigada por sempre me incentivar, desafiar, endoidar e divertir, sendo, apesar de maluco, muito afetuoso. Ao Denis, obrigada por acreditar em mim, permitir minha individualidade e me apoiar em tudo que invento. Você é uma das pessoas que mais admiro, tenho muito orgulho de ser sua orientanda e espero levar seus ensinamentos ao longo de toda a minha trajetória. Muito obrigada ao NEPEA por se tornar meu lugar favorito dentro da faculdade! Foi realmente um prazer cultivar tantas amizades e experiências nesses últimos anos.

Este projeto esteve vinculado ao projeto internacional “NANOGREEN – Nova geração de aditivos sustentáveis de base nanotecnológica para revestimentos anticorrosivos marítimos: uma abordagem multidisciplinar no espaço Atlântico” (CIRCNA/BRB/0291/2019), coordenado pelo Dr. Roberto Martins, da Universidade de Aveiro (Portugal), ao qual sou extremamente grata pela oportunidade de fazer parte.

Agradeço também ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC); à FAPESP (Processo #2020/03004-0), CAPES (Processo #88881.156405/2017–01), CNPq (Processo #308533/2018-6), e cooperação bilateral entre FCT e CAPES (ref. 4265 DRI/FCT). Essa ajuda e confiança foi fundamental para que eu concluísse meu trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Objetivo.....	14
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1. Organismo Teste.....	14
3.2. Preparo das Dispersões.....	16
3.3. Ensaio Ecotoxicológico.....	18
3.4. Análise dos resultados.....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Resultados Preliminares.....	20
4.2. Resultados Definitivos.....	21
5. Discussão.....	23
6. Conclusão.....	25
Referências.....	26
Anexo I.....	31
Anexo II.....	35

ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanocápsulas de Sílica.....	12
Figura 2. Ponto de coleta do mexilhão <i>Perna perna</i> ; A. Mapa do Brasil, com destaque para o estado de São Paulo; B. Mapa de São Paulo, com destaque para a Baixada Santista; C. Foto da boia sinalizadora externa próxima a Ponta Grossa, Guarujá; D. Mexilhões coletados.....	14
Figura 3. Gametas liberados após choque térmico; A. Gametas masculinos; B. Gametas femininos.....	16
Figura 4. Larvas Véliger (tipo D) de <i>Perna perna</i> , após cerca de 48h de desenvolvimento; A. Larvas D em uma câmara de Sedgewick Rafter; B. Exemplo de desenvolvimento normal; C. Exemplo de desenvolvimento anormal, com extravasamento do conteúdo interno.....	18
Figura 5. Porcentagem de larvas-D de <i>Perna perna</i> desenvolvidas ao longo das concentrações, no experimento preliminar com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.....	20
Figura 6. Porcentagem de larvas-D de <i>Perna perna</i> desenvolvidas ao longo das concentrações no primeiro experimento definitivo com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.....	21
Figura 7. Porcentagem de larvas-D de <i>Perna perna</i> desenvolvidas ao longo das concentrações no primeiro experimento definitivo com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.....	22

TABELAS

Tabela 1. Estrutura e propriedades físico-químicas do 2-mercaptobenzotiazol.....	10
Tabela 2. Concentrações de MBT, SiNC e SiNC-MBT (em mg/L) utilizadas nas soluções teste durante os testes de toxicidade com embriões de <i>Perna perna</i>	17
Tabela 3. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI ₅₀) obtidas para embriões de <i>Perna perna</i> expostos aos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT, em mg/L do experimento preliminar; *N.C.: não calculável.....	20
Tabela 4. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI ₅₀) dos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT, em mg/L do primeiro experimento definitivo.....	21
Tabela 5. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI ₅₀) dos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT (mg/L) do segundo experimento definitivo; *N.C.: não calculável.....	22

RESUMO:

Inibidores de corrosão (IC), como o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), são utilizados para retardar a degradação de superfícies metálicas expostas ao ambiente marinho, porém podem ser liberados na água e causar toxicidade sobre a biota marinha. Nanocápsulas mesoporosas de sílica (SiNC) podem ser usadas para encapsular os ICs, prevenindo interações indesejadas entre os componentes da tinta e o meio e reduzindo sua liberação. Além de ter alta eficiência na prevenção da corrosão, é desejável que os ICs nanoencapsulados tenham menor toxicidade do que os ICs livres. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos do MBT e suas formas nanoestruturadas (SiNC-MBT) em espécies marinhas tropicais e subtropicais. O mexilhão *Perna perna* é um modelo estabelecido para testes ecotoxicológicos, devido a fácil coleta, manipulação e alta sensibilidade. Este estudo visou comparar a toxicidade do MBT livre e nanoencapsulado em SiNC sobre embriões de *P. perna* por meio de um ensaio ecotoxicológico crônico de curta duração baseado na análise do desenvolvimento embriolarval. Soluções estoque de SiNC, MBT e SiNC-MBT foram preparadas por diluição dos sais em água do mar reconstituída e submetidas a um banho ultrassônico (40 kHz) por 30 min, e em seguida preparadas as soluções-teste. Os mexilhões foram coletados na Baía de Santos (SP, Brasil) e aclimatados em laboratório. A partir do processo de indução térmica, os gametas foram liberados, sendo examinados para sua qualidade. Foi realizada a fecundação in vitro, e cerca de 400 embriões foram expostos por réplica (tubos de ensaio contendo 10 mL de dispersão-teste) durante 48h. O teste foi encerrado pela adição de formaldeído tamponado a cada réplica, sendo em seguida verificada a taxa de desenvolvimento de larvas D (veliconcha) normais. Calculamos as concentrações inibitórias para 50% dos organismos expostos (CI50-48h) e determinamos as concentrações de efeito não observado (CENO) e de efeito observado (CEO), utilizando análise de variância (ANOVA) e teste post hoc de Dunnett para comparar cada concentração de tratamento diretamente com o controle. Em sua forma livre, o MBT apresentou toxicidade significativa ($p < 0,05$) a partir de 3,7 mg/L (CEO) nos dois testes realizados. A nanocápsula vazia (SiNC) apresentou toxicidade significativa a partir de 1,23 e 0,137 mg/L, por teste, respectivamente, sendo mais tóxica que o MBT livre. Por sua vez, o MBT nanoencapsulado apresentou a maior toxicidade. O aumento da toxicidade nas nanoestruturas em organismos de clima tropical quando em comparação aos de clima temperado, pode estar relacionada com o maior metabolismo dos organismos em temperaturas mais elevadas, tornando-os mais sensíveis. Além disso, as substâncias utilizadas podem ter um comportamento diferenciado em maiores temperaturas, tornando-se mais biodisponíveis ou reativas. A alta toxicidade do SiNC sugere resíduos de surfactantes utilizados durante sua produção, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Apesar da tecnologia de nanoestruturação ser bastante eficaz contra os processos de corrosão, aumentando a durabilidade do composto, mais estudos são necessários para compreender seu comportamento na toxicidade.

Palavras-chave: Nanomateriais; Embriolarval; Anticorrosivos.

ABSTRACT:

Corrosion inhibitors (CIs), such as 2-mercaptobenzothiazole (MBT), are used to inhibit the degradation of metallic surfaces exposed to the marine environment. However, they can be released to the water and cause toxicity to marine biota. Mesoporous silica nanocapsules (SiNC) can be used to encapsulate CIs, preventing undesirable interactions between the paint components and the environment, thereby reducing their release. In addition to having high efficiency in corrosion prevention, nanoencapsulated CIs should be less toxic than their respective free forms. However, little is known about the effects of MBT and its nanostructured forms (SiNC-MBT) on tropical and subtropical marine species. The brown mussel *Perna perna* is an established model for ecotoxicological testing, due to its easy collection, handling, and sensitivity to contaminants. This study aimed to compare the toxicity of free MBT and nanoencapsulated MBT in SiNC on *P. perna* embryos by using a short-term chronic toxicity test based on the analysis of larval development. Stock dispersions of SiNC, MBT, and SiNC-MBT were prepared by dispersing salts in reconstituted seawater and keeping them under an ultrasonic bath (40 kHz) for 30 minutes. Adult mussels were collected next to Ponta Grossa, Guarujá (SP, Brazil) and acclimated in the laboratory. Spawning was induced by thermal induction, and gametes were examined for their quality. Then, *in vitro* fertilization was performed, and about 400 eggs were added to each replicate (glass test tubes containing 10 mL of test dispersion) for 48 hours. The test was concluded by adding buffered formaldehyde to each replicate. The embryos were examined under microscope and the percentages of normal D-larval development rate in each replicate were determined. The inhibitory concentrations for 50% of exposed organisms (IC_{50-48h}) were calculated using the Probit's method, whereas the no observed effect (NOEC) and lowest observed effect concentrations (LOEC) were determined using one way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test to compare each treatment with the control. In its free form, MBT showed significant toxicity ($p < 0.05$) starting at 3.7 mg/L (LOEC) in both tests. The empty nanocapsule (SiNC) showed significant toxicity starting at 1.23 and 0.14 mg/L, respectively, in each test; SiNC was more toxic than free MBT. In turn, nanoencapsulated MBT showed the highest toxicity. Such higher toxicity of nanomaterials to tropical organisms, compared to temperate climate organisms, may be related to the higher metabolism of the organisms at elevated temperatures, making them more sensitive. Furthermore, the substances used may behave differently at higher temperatures, becoming more bioavailable or reactive. The high toxicity of SiNC suggests that residues of surfactants used during its production, such as Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), remain entrapped in the SiNC being lately released to the overlying water. Although nanostructuring technology is highly effective against corrosion processes, enhancing the durability of the compound, more studies are needed to understand its behavior regarding toxicity.

Keywords: Nanomaterials; Embryolarval; Anticorrosives.

1. Introdução

Superfícies metálicas, quando expostas ao ambiente, apresentam uma degradação gradativa natural (corrosão), causada por ações químicas e/ou eletroquímicas. A norma ISO 8044/1986 da Organização Internacional de Normalização define a corrosão como o processo de deterioração das estruturas metálicas. Essa degradação ocorre devido à interação físico-química entre os metais e seu ambiente (MATTSON, 1989), podendo ser influenciada por esforços mecânicos (GENTIL, 2012). O resultado desse fenômeno é a perda das propriedades originais dos metais (MORAIS *et al.*, 2018). As estruturas metálicas, amplamente utilizadas na indústria e em produtos de consumo, são frequentemente moldadas em formas que não são termodinamicamente estáveis (ROBERGE, 2008; FIGUEIRA, 2020). Quimicamente, a corrosão pode ser vista como a transformação do metal refinado em uma forma de energia mais estável (HA, 1996; MAZUMDER, 2020).

Em ambientes marinhos, estruturas metálicas estão constantemente expostas a um meio agressivo, no qual estão sujeitas à corrosão atmosférica e aquosa (KURTH *et al.*, 2019). Fatores determinantes incluem a alta salinidade e concentração de oxigênio dissolvido, potencializando significativamente a progressão do processo corrosivo (HOSEINZADEH *et al.*, 2013). Esta deterioração acelerada prejudica diretamente na durabilidade e desempenho dos materiais, causando desgaste, transformações químicas ou modificações estruturais (FRAUCHES-SANTOS *et al.*, 2014). Quando não tratadas adequadamente, as consequências dos processos corrosivos podem intensificar problemas ocasionados nas mais variadas atividades, como por exemplo, nas indústrias químicas, navais e petrolíferas; estruturas *offshore*; nos meios de transporte como navios; na medicina; entre outros (GENTIL, 2007). Portanto, o reparo e a manutenção (preventiva ou corretora) das estruturas afetadas pela corrosão são essenciais e demandam recursos econômicos significativos. Um estudo realizado pela *National Association of Corrosion Engineers* (NACE) apontou que entre 2013 e 2015, os custos globais relacionados à manutenção da corrosão foram estimados em 2,5 trilhões de dólares anuais, o que representava cerca de 3,4% do PIB (Produto Interno Bruto) mundial naquele período (KOCH, 2016; FIGUEIRA, 2020).

Atualmente, a aplicação de revestimentos protetores, visando retardar o processo corrosivo e incentivar a prevenção, é a abordagem mais comum para a proteção contra a corrosão. Nesse sentido, é pertinente buscar novas tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente amigáveis, com o objetivo de melhorar especificidades desses revestimentos e sua interação com o ambiente. Uma das principais alternativas adotadas pela indústria para prevenir e minimizar a corrosão é o uso dos inibidores de corrosão (IC)

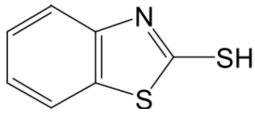
(FRAUCHES-SANTOS *et al.*, 2014), definidos como substâncias capazes de reduzir ou eliminar a corrosão, quando presentes em concentrações adequadas no meio corrosivo (MORAIS *et al.*, 2018). Além do uso de ICs, outros principais métodos anticorrosivos incluem a aplicação de proteção catódica e anódica em superfícies metálicas (FRAUCHES-SANTOS *et al.*, 2014), de forma não excludente ao uso de ICs.

Os ICs podem ser classificados pela sua composição: orgânica ou inorgânica; ou pela sua ação: catódicos, anódicos, mistos ou de adsorção (GENTIL, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2002). Os ICs inorgânicos normalmente são constituídos à base de cromatos, óxidos e nitritos, sendo utilizados por décadas e considerados eficientes, porém alguns estudos relataram que estas substâncias são nocivas ao meio ambiente por conta do alto grau de toxicidade aos organismos (SHCHUKIN, 2008; PALOU *et al.*, 2014), como observado em bactérias, invertebrados e peixes (TYAS *et al.*, 1978; HARTWELL *et al.*, 1995; CORNELL *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2017; AVELELAS *et al.*, 2017). Além disso, outros estudos demonstraram que alguns destes compostos são considerados agentes carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (RANI & BASU, 2012), a ponto de determinadas substâncias terem seu uso proibido na União Europeia desde 2007 (TEDIM *et al.*, 2010).

Apesar de eficazes, os ICs inorgânicos apresentam uma alta toxicidade quando inseridos no ambiente marinho. Logo, abriu espaço à uma geração de compostos orgânicos. Estes podem ser sintéticos ou naturais, apresentam em suas estruturas: nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio (MORAIS *et al.*, 2018). São inibidores de adsorção, que aderem às regiões catódicas e/ou anódicas do metal, promovendo maior proteção (FRAUCHES-SANTOS *et al.*, 2014), como o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), com sua alta capacidade de proteção e praticidade nos processos de síntese e aplicação.

O 2-Mercaptobenzotiazol (Tabela 1) é um composto aromático heterocíclico que contém nitrogênio e enxofre em sua estrutura química (C₇H₅NS₂). Apesar de insolúvel em água, o MBT demonstra solubilidade em vários solventes orgânicos, como etanol, éter dietílico e ácido acético. Além disso, ele se dissolve em soluções alcalinas e em ambientes orgânicos que incluem bases de amina (WU *et al.*, 2012; BOLZONI, 2022).

Tabela 1. Estrutura e propriedades físico-químicas do 2-mercaptobenzotiazol.

Composto químico	2-Mercaptobenzotiazol
Estrutura Química	
Fórmula Química	C ₇ H ₅ NS ₂
Peso Molecular	167,25

Fonte: Modificado de Liao *et al.* (2018).

Destacando-se pela versatilidade e pelo baixo custo de produção, o MBT é extremamente atraente para diversas aplicações químicas e industriais. A sua composição facilita a formação de complexos hidrofóbicos, que funcionam como uma barreira física entre o ambiente corrosivo e a superfície metálica (RANI & BASU, 2012; WU *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2006). Devido ao seu excelente desempenho em meios ácidos, o MBT é um candidato promissor para substituir compostos de cromato, sendo adequado para uso em vários metais, como ferro, cobalto, níquel e, especialmente, cobre (OHSAWA & SUËTAKA, 1979; WU *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2020).

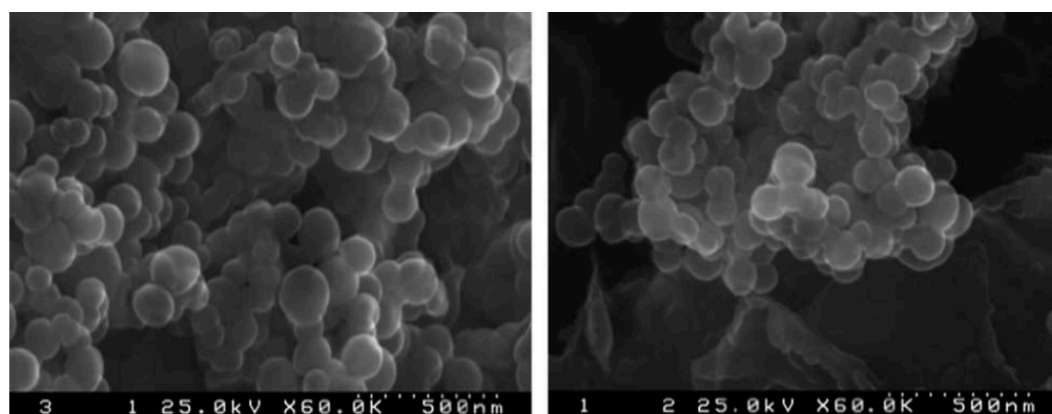
Enquanto anticorrosivo, o uso de MBT tem sido comum em tintas marinhas e sistemas de recirculação de água, ocasionando, portanto, o seu descarte em ecossistemas aquáticos (MARTINS *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2012). Em regiões como Espanha, Alemanha e China, foram encontradas concentrações ambientais, principalmente por águas residuais tanto industriais quanto urbanas, variando entre 0.00026 a 1.1 µg/L. Portanto, é fundamental considerar os impactos ambientais associados ao seu uso e descarte, especialmente em aplicações em larga escala (SANYAL, 1981). A toxicidade do MBT vem sendo estudada para alguns organismos, como cladóceros (NAWROCKI *et al.*, 2005), truta arco-íris (MILANOVA *et al.*, 2018) ou em modelos matemáticos (JIANG *et al.*, 2021), porém ainda precisa ser investigada para organismos marinhos, particularmente em regiões tropicais, permitindo um amplo entendimento de como seus efeitos podem atingir também espécies não-alvo, delimitando também faixas de concentrações seguras para o seu uso.

Recentemente, a imobilização de compostos para inibidores de corrosão tem sido testada através do uso de nanomateriais (NM) (MARTINS *et al.*, 2017), materiais produzidos intencionalmente em uma nano escala (1-100 nm) (KREYLING *et al.*, 2010; EC, 2011). Além de minimizar a ação dos compostos potencialmente danosos ao ambiente aquático, esses NM

podem potencializar a eficiência de tintas marítimas anticorrosivas. A imobilização/encapsulamento previne a interação dos IC com outros componentes da tinta que podem levar a reações e perdas indesejadas de efeito protetor. 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 (RCEP, 2008; POZNYAK *et al.*, 2009; TEDIM *et al.*, 2010; ZHELUDKEVICH *et al.*, 2010; MAIA *et al.*, 2012; ZHELUDKEVICH *et al.*, 2013). Portanto, o encapsulamento dos compostos ativos por nanocápsulas mesoporosas de sílica (SiNC) é uma alternativa promissora para minimizar os impactos das substâncias ao ambiente marinho (POZNYAK *et al.*, 2009; ZHELUDKEVICH *et al.*, 2010; TEDIM *et al.*, 2010; MAIA *et al.*, 2012).

Essas nanocápsulas de sílica apresentam uma cavidade interna vazia e uma camada externa com poros de tamanhos variados, por isso são consideradas mesoporosas. Tal estrutura age como um reservatório, conferindo maior capacidade de armazenamento do composto imobilizado. Enquanto o composto fica armazenado em sua cavidade interna, sua liberação é desencadeada através de estímulos nos mesoporos, que apresentam respostas ligeiramente distintas de acordo com gatilhos agressivos do meio, como pH ou salinidade, prolongando a duração do composto associado ao SiNC. Uma vez que favorecem essa liberação controlada do inibidor de corrosão, as nanocápsulas mesoporosas oferecem, consequentemente, uma proteção anticorrosiva mais eficiente (MAIA *et al.*, 2012).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanocápsulas de Sílica.



Fonte: MAIA *et al.* Nanoscale, 2012.

Entretanto, os anticorrosivos inovadores (i.e. formas nanoestruturadas) precisam não só apresentar eficiência semelhantes aos IC livres, mas também toxicidade inferior quando imobilizados pelo SiNC, cujos efeitos sobre organismos marinhos de ambientes temperados

são conhecidamente baixos (AVELELAS *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Pouco se sabe sobre o efeito desses NM para organismos de clima tropical e subtropical, bem como sobre os efeitos de diversos contaminantes, uma vez que os parâmetros utilizados nas legislações brasileiras, por exemplo, foram retirados de legislações estrangeiras com organismos de clima temperado ou polar (BRASIL, 2005). Projetos atualmente conduzidos em nosso laboratório têm mostrado que, para alguns organismos tropicais, pode haver toxicidade associada a esses novos nanomateriais (BEVERARI *et al.*, 2023), mesmo que para organismos de clima temperado, a nanoestruturação seja satisfatória no sentido de reduzir a toxicidade (MARTINS *et al.*, 2017). Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar o perfil ecotoxicológico desses compostos, visando avaliar seu uso comercial.

A ecotoxicologia é uma interseção entre a toxicologia - estudo dos efeitos tóxicos de substâncias nos organismos vivos - e a ecologia - estudo das interações entre os organismos e seus ambientes (HOFFMAN *et al.*, 2002). Portanto, ensaios ecotoxicológicos contribuem não só com respostas fisiológicas dos organismos expostos a toxinas, mas também em como esses efeitos podem modificar o funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas, alterando a biodiversidade, a estrutura da comunidade biológica e os processos ecológicos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2002).

A escolha dos organismos teste advém de diversos fatores, como sensibilidade, importância econômica e fácil manuseio, por isso os invertebrados aquáticos, principalmente por seu ciclo de vida rápido e alta sensibilidade em estágios iniciais de desenvolvimento, são modelos adequados em testes de toxicidade (ABNT, 2022). O mexilhão *Perna perna* apresenta grande potencial em testes ecotoxicológicos no Brasil, atendendo aos requisitos de espécie bioindicadora, como fácil coleta, manipulação e sensibilidade, além do seu alto interesse econômico, devido ao seu elevado consumo na gastronomia nacional e internacional. O desenvolvimento embriolarval de diversos invertebrados, incluindo o *P. perna*, tem sido comumente utilizado em ensaios crônicos de curta duração, que avaliam etapas sensíveis do desenvolvimento, quando ocorrem muitas reações metabólicas. Aproximadamente 6h após a fecundação são formadas larvas trocóforas, tornando-se veliger (larva D) após 24h, sendo portanto susceptíveis a ação de agentes estressores (ABNT, 2022).

Portanto, para analisar e comparar a toxicidade do SiNC-MBT, do MBT livre e da nanocápsula vazia (SiNC), foi escolhido o ensaio crônico de curta duração com embriões de mexilhões da espécie *P. perna*.

2. Objetivo

O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos da exposição do 2-mercaptobenzotiazol (MBT), em sua forma livre e imobilizada em nanocápsulas de Sílica (SiNC), sobre o desenvolvimento embriolarval do mexilhão *Perna perna*.

A principal hipótese deste projeto é:

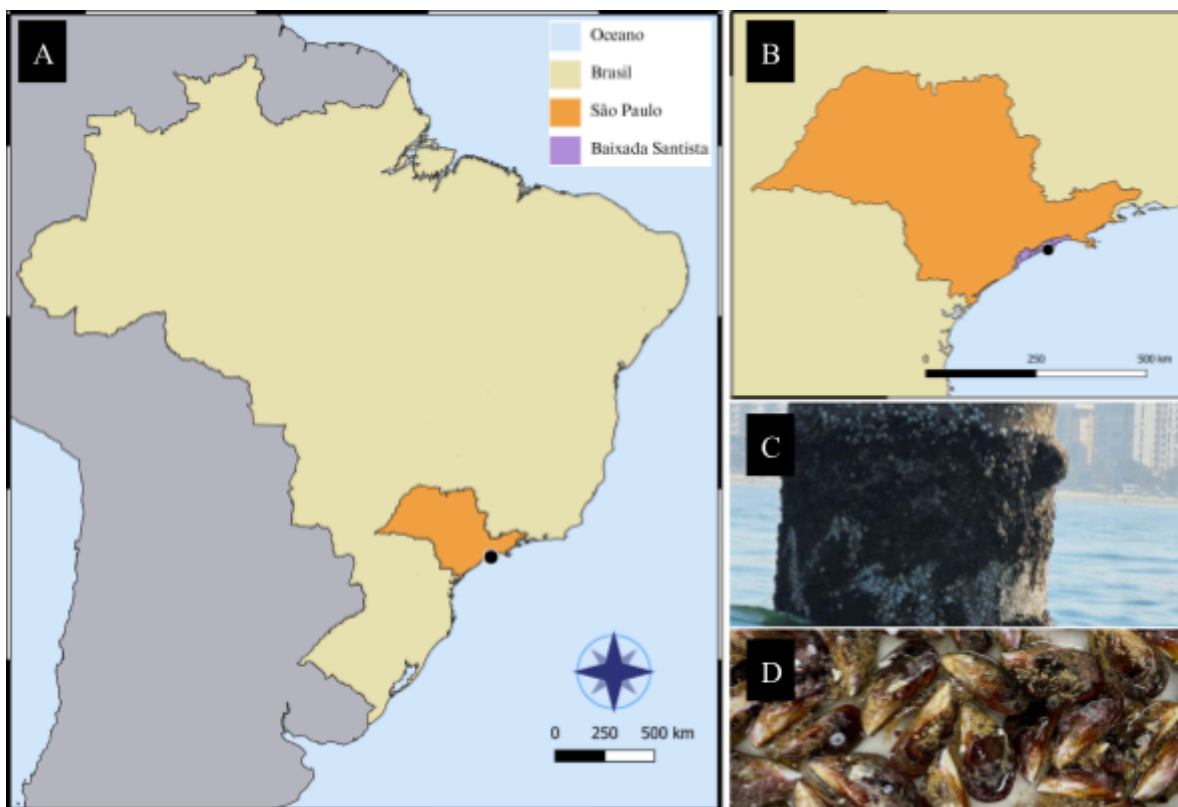
- O IC nanoencapsulado terá uma toxicidade menor quando comparado à sua forma livre.

3. Materiais e Métodos

3.1. Organismo Teste

O mexilhão *Perna perna*, espécie de molusco bivalve amplamente distribuída nas águas costeiras tropicais e subtropicais do Atlântico e do Índico, tem se destacado como um modelo ecotoxicológico importante, devido à sua acessibilidade, respostas fisiológicas a contaminantes e relevância ecológica e econômica. Constitui um importante recurso para a pesca e a aquicultura, sendo uma fonte de alimento de baixo custo e baixo impacto ambiental. cuja exploração pode gerar renda para comunidades costeiras (FERREIRA *et al.*, 2013). Do ponto de vista ecológico, o *P. perna* desempenha um papel crucial nos ecossistemas marinhos e estuários. Filtradores naturais, os mexilhões ajudam a melhorar a qualidade da água, removendo partículas em suspensão, fitoplâncton e bactérias, contribuindo para a manutenção dos ecossistemas aquáticos (NASCIMENTO, 2002). No presente estudo, indivíduos adultos de *P. perna* foram coletados nas boias sinalizadoras mais externas, localizadas próximo da Ponta Grossa, no Guarujá (Figura 2).

Figura 2. Ponto de coleta do mexilhão *Perna perna*; **A.** Mapa do Brasil, com destaque para o estado de São Paulo; **B.** Mapa de São Paulo, com destaque para a Baixada Santista; **C.** Foto da boia sinalizadora externa próxima a Ponta Grossa, Guarujá; **D.** Mexilhões coletados.



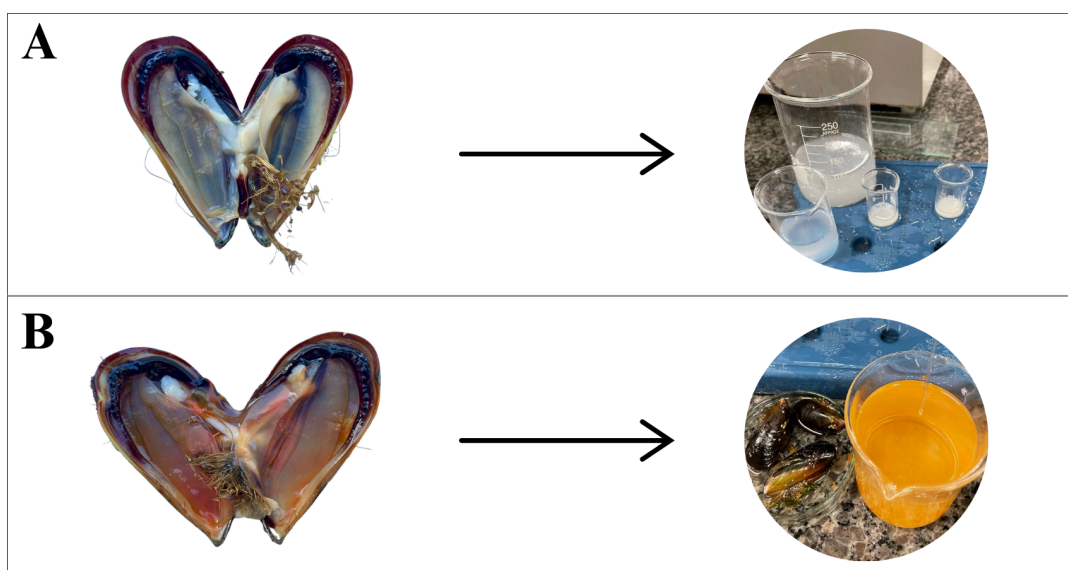
Fonte: Camila Prieto Martins.

Sua alta sensibilidade a poluentes, facilidade de manejo e capacidade de fornecer dados sobre desenvolvimento e morfologia tornam os embriões de mexilhão ideais para determinar efeitos ecológicos de contaminantes (ZARONI *et al*, 2005). Portanto, representam um modelo sensível para detectar efeitos subletais que não são observados facilmente em estágios mais avançados da vida, como os adultos, e apresentam um tempo de resposta fisiológica aos contaminantes relativamente rápido, fazendo com que seus ensaios sejam também fundamentais e tenham grande aplicação para a avaliação de riscos ambientais a longo prazo (ABNT, 2022).

Para a liberação dos gametas, os mexilhões, dispostos em bandejas, foram primeiramente limpos de incrustações e submetidos ao processo de choque térmico. Por pelo menos 30 min, os organismos foram imersos em 3 tratamentos: água do mar na temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), água do mar refrigerada ($\pm 15^{\circ}\text{C}$) e água do mar aquecida ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) (REIS Fo & RESGALLA JR, 2002; ZARONI *et al.*, 2005; ABNT, 2022). Assim que a liberação inicia, é possível identificar o sexo (Figura 3), e imediatamente os organismos são separados

por sexo em placas de petri e seus gametas são armazenados em béqueres. Os gametas masculinos são mantidos refrigerados sobre gelo para que posteriormente seja feita uma solução espermática (0,5 mL de gameta para 24,5 mL de água do mar reconstituída), quando são ativados. Os óvulos precisam ser bem lavados durante todo o processo, evitando a contaminação por protozoários, e assim, após decantarem no béquer, o sobrenadante é descartado, garantindo que os óvulos mais densos, consequentemente com mais vitelo, prevaleçam, completando o béquer com água do mar reconstituída e filtrada, sendo esse procedimento repetido ao menos 3 vezes. Antes da fecundação, três alíquotas de 40 µL das soluções de óvulos bem lavados foram analisadas em microscópio com auxílio de câmara Sedgewick-Rafter para conferir sua qualidade e determinar o volume necessário para serem adicionados em torno de 400 embriões por tubo de ensaio (i.e. réplicas). Para a fecundação, 1-2 mL da solução espermática é misturada com 500 mL dos óvulos lavados (adaptado de ABNT, 2022).

Figura 3. Gametas liberados após choque térmico; **A.** Gametas masculinos; **B.** Gametas femininos.



Fonte: Camila Prieto Martins.

3.2. Preparo das Dispersões

As dispersões estoque foram preparadas em 100 mg/L, a partir da adição de 0,01 mg dos compostos em sua forma livre - SiNC e MBT - com água do mar reconstituída (salinidade 35), em um balão volumétrico de capacidade de 100 mL. Como o objetivo é avaliar a toxicidade do MBT, para sua forma nanoestruturada, SiNC-MBT, foi adicionado 0,066 mg do composto, pois foi considerado 100 mg/L do MBT - cerca de 33% da mistura. Para garantir

melhor dispersão do nanomaterial, uma vez que não se dissolvem (LOZA *et al*, 2019), todas foram submetidas a um banho ultrassônico (40 kHz) por pelo menos 30 minutos.

As dispersões teste foram preparadas a partir da diluição das dispersões estoque em água do mar reconstituída (salinidade 35). Além do controle, que é apenas a água do mar reconstituída, preparamos pelo menos 5 concentrações em cada teste, com fator 3 de diluição. A partir da análise dos resultados do teste preliminar, quando necessário uma concentração intermediária foi adicionada, buscando, refinar a curva de concentração utilizada. No teste preliminar, todos os compostos contaram com 5 concentrações: 1,23; 3,7; 11,11; 33,33; 100 mg/L. No primeiro teste, foram usadas 5 concentrações para (MBT e SiNC: 0,41; 1,23; 3,7; 11,11; 22,22 mg/L; enquanto para o SiNC-MBT foram usadas 0,137; 0,41; 1,23; 3,7; e 11,11 mg/L. No segundo teste definitivo, foram utilizadas 7 concentrações: MBT (0,137; 0,41; 1,23; 3,7; 11,11; 22,22; 33,33 mg/L); SiNC (0,137; 0,41; 1,23; 3,7; 7,405; 11,11; 33,33 mg/L); SiNC MBT (0,137; 0,41; 0,82; 1,23; 3,7; 11,11; 33,33 mg/L). As concentrações usadas em cada experimento estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de MBT, SiNC e SiNC-MBT (em mg/L) utilizadas nas dispersões teste durante os testes de toxicidade com embriões de *Perna perna*.

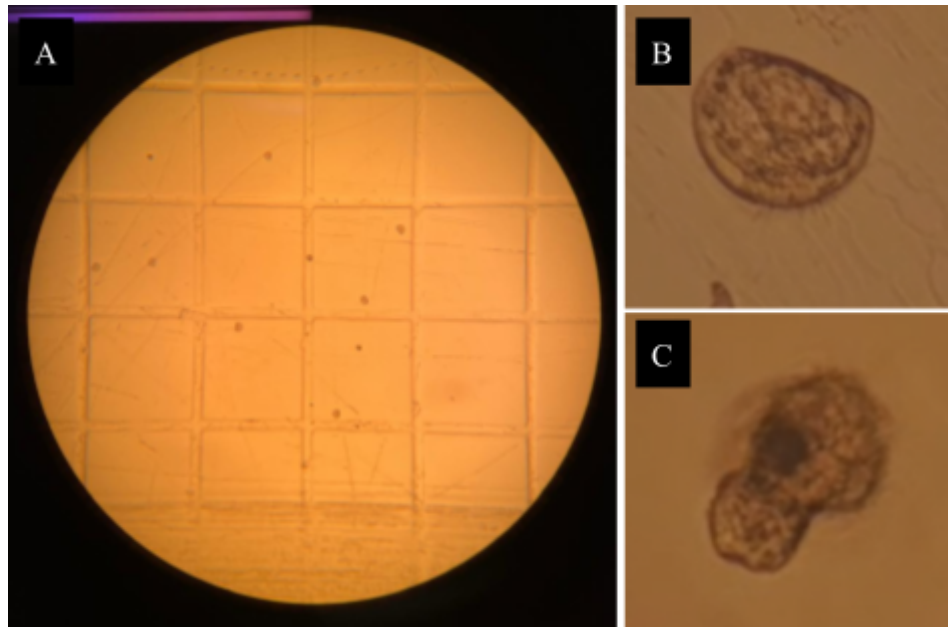
<i>Teste Preliminar</i>			
Concentrações mg/L	MBT	SiNC	SiNC MBT
C1		1,23	
C2		3,7	
C3		11,11	
C4		33,3	
C5		100	
<i>Teste 1</i>			
Concentrações mg/L	MBT	SiNC	SiNC MBT
C1	0,41		0,137
C2	1,23		0,41
C3	3,7		1,23
C4	11,11		3,7
C5	22,22		11,11

<i>Teste 2</i>			
Concentrações mg/L	MBT	SiNC	SiNC MBT
C1	0,137	0,137	0,137
C2	0,41	0,41	0,41
C3	1,23	1,23	0,82
C4	3,7	3,7	1,23
C5	11,11	7,405	3,7
C6	22,22	11,11	11,11
C7	33,33	33,33	33,33

3.3. Ensaio Ecotoxicológico

Foram realizados três testes de toxicidade crônico de curta duração com os embriões de *P. perna* (um teste preliminar e dois definitivos). Seguindo a norma técnica NBR 16456 (ABNT 2022), os testes foram iniciados após a adição de cerca de 400 ovos recém fecundados em cada réplica (tubos de ensaio de 15 mL contendo as diferentes concentrações das dispersões das substâncias estudadas: MBT, SiNC e SiNC-MBT). A exposição durou cerca de 48h, período necessário para os ovos se desenvolverem até o estágio de larva D. O sistema-teste foi mantido em câmara de germinação, com fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro), a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. O teste foi encerrado pela adição de formaldeído (4%) tamponado com bórax, sendo verificada a taxa de desenvolvimento de larvas D (veliconcha) normais, assim com as alterações no desenvolvimento (Figura 4).

Figura 4. Larvas Véliger (tipo D) de *Perna perna*, após cerca de 48h de desenvolvimento; **A.** Larvas D em uma câmara de Sedgewick Rafter (visão geral); **B.** Exemplo de Larva D normal; **C.** Larva D com desenvolvimento anormal, com extravasamento do conteúdo interno e alteração morfológica da protoconcha.



Fonte: Camila Prieto Martins; Maysa Ueda de Carvalho.

3.4. Análise dos resultados

Garantindo a confiabilidade do experimento, todos os testes contaram com respectivos controles analíticos negativos (i.e., exposição à água do mar limpa e não tóxica). Para cada um dos 3 testes foi realizado também um ensaio com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), surfactante amplamente utilizado em estudos de toxicologia. O DSS é conhecido por causar estresse celular e danos à membrana, podendo afetar a integridade das células e dos tecidos em desenvolvimento em um embrião (ZARONI *et al.*, 2005). Dessa forma, ao comparar os dados de uma carta controle do DSS com embriões de *P. perna*, é possível verificar se a sensibilidade do lote de embriões usados no teste estava dentro da faixa aceitável (DEL CIELO, 2013).

A primeira etapa da análise dos resultados do teste de toxicidade crônica foi a identificação das diferenças entre os tratamentos e respectivos controles. Os resultados do teste de toxicidade crônica foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene), respectivamente. Em seguida, utilizando o software GraphPad Prism V.5., os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$), visando identificar diferenças

entre os tratamentos e os respectivos controles. Com base nos cálculos foi possível estimar a Concentração de Efeito Observável (CEO) e a Concentração de Efeito Não Observável (CENO).

A segunda etapa foi o cálculo das concentrações inibitórias para 50% dos organismos expostos (CI_{50-48h}). Foi analisado, utilizando o software Statistica, usando o método dos Probitos seguido de regressão não linear, selecionando a equação de regressão que melhor se ajustava aos dados, considerando o valor de R^2 , soma absoluta dos quadrados e os intervalos de confiança de 95%.

4. Resultados

4.1. Resultados Preliminares

O cálculo do gradiente de concentração inicial, com fator de diluição 3, serviu como base para o teste preliminar. Dessa forma, foi possível observar quais concentrações ajustar para entender melhor os padrões de toxicidade do composto. À medida que as concentrações aumentavam, a toxicidade ocorria de maneira mais abrupta. No MBT, por exemplo, observa-se que enquanto a concentração de 11,11 mg/L apresenta cerca de 67% dos embriões desenvolvidos, a próxima concentração - de 33,33 mg/L - não apresenta nenhum, ocorrendo 100% de inibição no desenvolvimento embrionário (Figura 4). Portanto, concentrações intermediárias nos próximos testes podem preencher essa lacuna de resposta entre concentrações.

Ainda refletindo a necessidade de aperfeiçoamento do gradiente de concentração utilizado, podemos notar na Tabela 3 que, por conta da inibição abrupta no desenvolvimento, não foi possível estimar a CI_{50} para o MBT e para o SiNC MBT.

Figura 5. Porcentagem de larvas-D de *Perna perna* desenvolvidas ao longo das concentrações, no experimento preliminar com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.

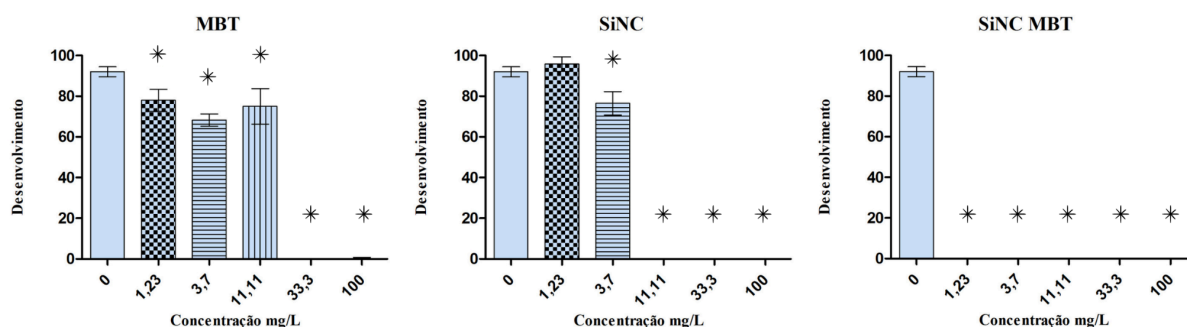


Tabela 3. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI₅₀) obtidas para embriões de *Perna perna* expostos aos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT, em mg/L do experimento preliminar; *N.C.: não calculável.

Composto	CENO	CEO	CI ₅₀
MBT	*N.C.	1,23	26,33 (12,86-39,8)
SiNC	1,23	3,7	4,49 (2,83 - 7,12)
SiNC-MBT	*N.C.	≥1,23	*N.C.

4.2. Resultados Definitivos

Para o primeiro ensaio embriolarval definitivo, além da adição de uma concentração menor em todos os compostos, e consequente exclusão da concentração mais alta, o SiNC-MBT foi o composto que teve mais ajustes. Por ter apresentado diferença significativa no desenvolvimento a partir da concentração de 1,23 mg/L, (Tabela 3) outras duas concentrações menores foram adicionadas, seguindo o fator 3 de diluição (Figura 6).

Nos três casos, todas as concentrações a partir da CEO (concentração de efeito de observada) apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O SiNC-MBT, mesmo com concentrações mais baixas, manteve o padrão de inibição total no desenvolvimento embrionário nas duas últimas concentrações (Figura 6).

Quanto menor a CI₅₀ do composto, maior é sua toxicidade, pois significa que uma concentração menor já causa inibição em pelo menos 50% dos organismos. Portanto, conseguimos ordenar o primeiro teste definitivo pelo nível de toxicidade: MBT > SiNC > SiNC-MBT mg/L (Tabela 4). O IC nanoencapsulado apresentou a menor CI₅₀ entre os compostos estudados, portanto, a maior toxicidade. O IC em sua forma livre apresentou a menor toxicidade. A nanocápsula de sílica apresentou menor toxicidade do que o IC nanoencapsulado, porém maior em relação ao IC livre. A comparação dos valores de CI₅₀ sugere uma interação aditiva entre SiNC e MBT.

Figura 6. Porcentagem de larvas-D de *Perna perna* desenvolvidas ao longo das concentrações no primeiro experimento definitivo com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.

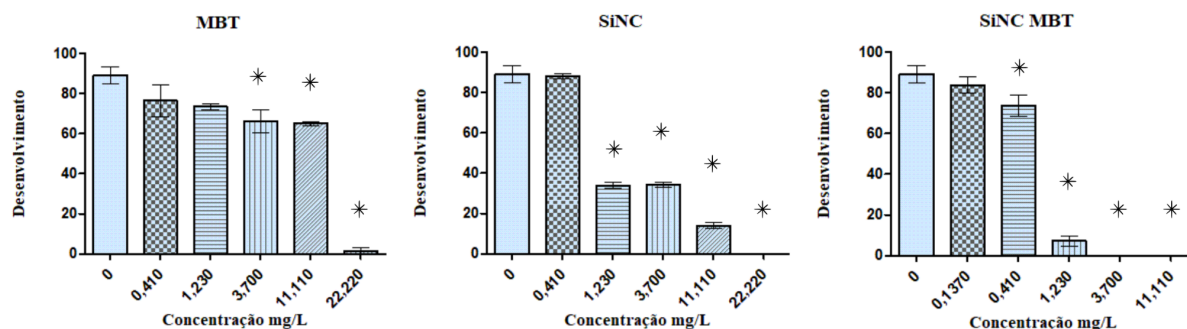


Tabela 4. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI50) dos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT, em mg/L do primeiro experimento definitivo.

Composto	CENO	CEO	CI ₅₀
MBT	1,23	3,7	11,24 (9,64 - 12,83)
SiNC	0,41	1,23	0,9 (0,63 - 1,28)
SiNC MBT	0,137	0,415	0,65 (0,54 - 0,78)

Para finalizar os experimentos, auxiliando com a compreensão dos dados e buscando aprimorar ainda mais a escala de concentrações, sete concentrações foram utilizadas no segundo ensaio embriolarval definitivo (Tabela 2).

Novamente, nos três casos, todas as concentrações a partir da CEO apresentaram diferença significativa em relação ao controle. O SiNC-MBT, mesmo com concentrações mais baixas, manteve o padrão de inibição total no desenvolvimento embrionário nas duas últimas concentrações (Figura 7). Os três compostos causaram inibição total no desenvolvimento quando na concentração de 33,33 mg/L. Mesmo apresentando quedas menos abruptas, tanto o SiNC quanto o SiNC-MBT apresentaram diferença significativa em relação ao controle já na primeira concentração de 0,137 mg/L (Tabela 5).

Conseguimos ordenar o segundo teste definitivo pelo nível de toxicidade a partir da CI50 (mg/L): SiNC-MBT > SiNC > MBT. Novamente, o IC nanoencapsulado apresentou a menor CI50 entre os compostos estudados, e portanto, a maior toxicidade. A nanocápsula de sílica apresentou menor toxicidade do que o Teste 1 (Tabela 3), porém, ainda assim mostrou toxicidade significativa. A CEO calculada para o MBT foi a mais alta entre os compostos

estudados, indicando que sua toxicidade não foi tão marcante quanto sua forma encapsulada ou quanto a nanocápsula vazia.

Figura 7. Porcentagem de larvas-D de *Perna perna* desenvolvidas ao longo das concentrações no primeiro experimento definitivo com MBT, SiNC, e SiNC-MBT.

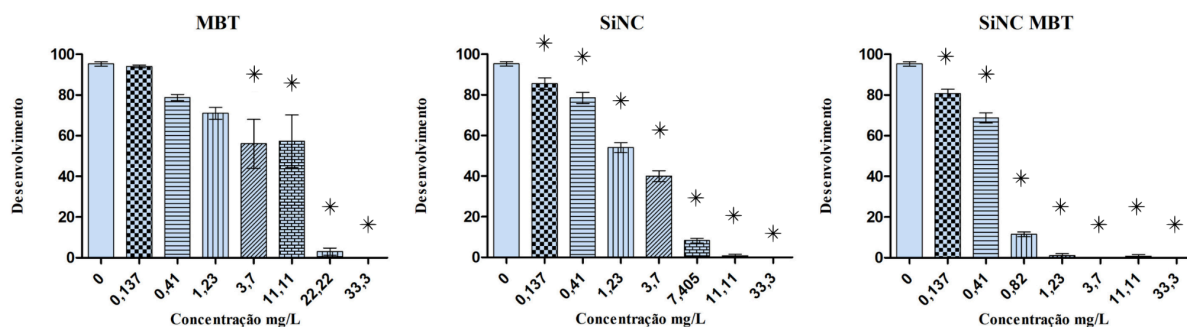


Tabela 5. Concentração de Efeito Não Observado (CENO), Concentração de Efeito Observada (CEO) e Concentração de Inibição de 50% dos organismos (CI₅₀) dos compostos MBT, SiNC, e SiNC-MBT (mg/L) do segundo experimento definitivo; *N.C.: não calculável.

Composto	CENO	CEO	CI ₅₀
MBT	1,23	3,7	11,29 (9,76 - 12,83)
SiNC	*N.C.	0,137	3,561 (2,337 - 5,426)
SiNC MBT	*N.C.	0,137	0,53 (0,47 - 0,6)

5. Discussão

A principal hipótese deste estudo, de que a nanoencapsulação do inibidor de corrosão MBT reduziria sua toxicidade, foi refutada pelos resultados obtidos. Nos testes definitivos, o MBT livre apresentou a menor toxicidade, enquanto o MBT nanoencapsulado (SiNC-MBT) exibiu a maior toxicidade entre os compostos analisados. A alta toxicidade da formulação SiNC-MBT foi inesperada, considerando que o encapsulamento visava diminuir a biodisponibilidade e, consequentemente, o impacto tóxico do biocida. No entanto, os dados indicam um efeito aditivo ou sinérgico, no qual as propriedades das SiNC se somam ou potencializam a toxicidade do MBT, evidenciado pelos valores de CI₅₀ mais baixos. Além disso, o presente estudo revelou uma toxicidade significativa das SiNC vazias, reforçando a necessidade de considerar uma toxicidade intrínseca às nanopartículas de sílica. Estudos

anteriores já destacaram a sensibilidade de organismos marinhos ao SiNC, como o caso do *Perna perna*, que apresentou uma CENO abaixo de 0,250 mg/L e uma CI_{50} de 0,16 mg/L (SANTOS *et al.*, 2020). Em outras espécies, como o copépodo estuarino *Nitokra* sp., foi relatada CENO de 1 mg/L e CI_{50} de 12,8 mg/L (PERINA *et al.*, 2023). Sugere-se que a alta toxicidade da SiNC, relatada também em outros trabalhos, seja a partir de resíduos de surfactantes, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), utilizados nas etapas finais da síntese das nanocápsulas, podendo afetar não só a dispersibilidade, como também a interação das nanopartículas com sistemas biológicos (MAIA *et al.*, 2015). Um estudo comparativo da toxicidade de tensoativos em organismos marinhos revelou que o CTAB foi o mais tóxico (KACZERESKA *et al.* 2020), corroborando a possibilidade da toxicidade observada nas SiNC ter uma relação com o CTAB.

Estudos realizados em espécies temperadas, como *Crassostrea gigas* e *Dunaliella salina*, indicam que o encapsulamento de biocidas pode ser benéfico em termos de desempenho funcional e redução de toxicidade (DE CAMPOS *et al.*, 2022; AVELELAS *et al.*, 2017). No entanto, para organismos tropicais e subtropicais, como *P. perna*, o metabolismo acelerado em temperaturas mais elevadas pode aumentar a absorção dos contaminantes, ao mesmo tempo em que a temperatura mais elevada promove maior biodisponibilidade e reatividade dos compostos encapsulados (SPITZMÜLLER *et al.*, 2023).

Os resultados deste estudo reforçam, portanto, a necessidade de otimizar a produção do SiNC, considerando a substituição de surfactantes tóxicos, como o CTAB, por alternativas menos prejudiciais, ou reavaliando as etapas finais de eliminação de resíduos durante sua produção. Embora estudos anteriores tenham demonstrado o potencial de nanocápsulas carregadas com biocidas para melhorar a eficácia de revestimentos anticorrosivos (MAIA *et al.*, 2012), nossos achados indicam que a formulação atual pode apresentar riscos ecológicos, particularmente em ambientes tropicais. Há extrema importância em equilibrar a eficácia funcional dos materiais com sua segurança ecológica, especialmente em regiões com alta sensibilidade a nanopartículas, como as zonas costeiras tropicais. Portanto, futuros desenvolvimentos devem focar em ajustes no processo de encapsulação e substituição de componentes potencialmente tóxicos para garantir a sustentabilidade e segurança ambiental dessas tecnologias inovadoras (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; GUTNER-HOCH *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2020).

6. Conclusão

Os resultados obtidos sobre o desenvolvimento embrionário do mexilhão *Perna perna* evidenciam o potencial tóxico das substâncias testadas, com destaque para a maior toxicidade dos compostos nanoencapsulados. Contrariando a hipótese inicial, a encapsulação em SiNC não reduziu a toxicidade do MBT, mas, ao contrário, parece ter potencializado seus efeitos nocivos. Esse aumento de toxicidade pode ser atribuído, em parte, à presença de surfactantes, como o CTAB, utilizados durante a síntese das SiNC, que podem deixar resíduos no produto final, afetando negativamente os organismos expostos.

Este estudo ressalta a importância de avaliações ecotoxicológicas prévias para tecnologias baseadas em nanoencapsulação, especialmente em ambientes tropicais, onde a sensibilidade dos organismos pode ser exacerbada devido às altas taxas metabólicas e maior biodisponibilidade dos compostos. Além de explorar a eficácia anticorrosiva, futuros trabalhos devem focar em entender melhor os mecanismos de toxicidade associados aos nanomateriais, assim como investigar alternativas menos tóxicas para o processo de encapsulação. Tendo em vista os dados observados, a formulação atual de SiNC-MBT deveria ser cuidadosamente reconsiderada, e esforços deveriam ser direcionados para a otimização do encapsulamento, visando reduzir o impacto ambiental e garantir a segurança ecológica. A continuidade desses estudos é essencial para desenvolver soluções anticorrosivas inovadoras que sejam eficazes e ambientalmente sustentáveis, contribuindo para a proteção dos ecossistemas marinhos.

Referências

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2022). Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio de curta duração com embriões de mexilhões (Mollusca-Bivalvia). Norma ABNT NBR 16456:2022.
- Avelelas, F., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Malheiro, E., Soares, A. M. V. M., ... Tedim, J. (2017). Efficacy and Ecotoxicity of Novel Anti-Fouling Nanomaterials in Target and Non-Target Marine Species. *Marine Biotechnology*, 19(2), 164–174. doi:10.1007/s10126-017-9740-1
- 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*).
- Bolzoni, F., Brenna, A., & Ormellese, M. (2022). Recent advances in the use of inhibitors to prevent chloride-induced corrosion in reinforced concrete. *Cement and Concrete Research*, 154, 106719. doi:10.1016/j.cemconres.2022.106719
- BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente.
- Cornell, J.S., Pillard, D.A., Hernandez, M.T. (2000). Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 19(6), p. 1465-1472. *Revista Ceciliana* Dez 3(2): 27-30, 2011 ISSN 2175-7224
- de Campos, B. G., do Prado e Silva, M. B. M., Avelelas, F., Maia, F., Loureiro, S., Perina, F., Abessa, D. M. de 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*, 29(18), 27534-27547. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17842-3>
- Del Cielo, C. C., Malgarin, J., & Resgalla, C. (2013). Review of embryo-larval assay of the mussel *Perna perna* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2), 37–43. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.02.006>
- 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.

- Feng, Y., Chen, S., Zhang, H., Li, P., Wu, L. & Guo, W. (2006). Characterization of iron surface modified by 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayers. *Applied Surface Science*, 253(5), 2812–2819.
- Ferreira, M. da S., Mársico, E. T., Conte Junior, C. A., Marques Júnior, A. N., Mano, S. B., & Clemente, S. C. de S. (2013). Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. *Ciência Rural*, 43(6), 1012–1020. doi:10.1590/s0103-84782013005000062
- Figueira, R. B. (2020). Hybrid Sol–gel Coatings for Corrosion Mitigation: A Critical Review. *Polymers*, 12(3), 689. doi:10.3390/polym12030689
- Figueiredo J., et al. (2019). Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. *Environmental Science: Nano*, 50, 75–87.
- Frauches-Santos, C., Albuquerque, M. A., Oliveira, M.C., Echevarria, A. (2014). A corrosão e os agentes anticorrosivos. *Revista virtual de química*, v. 6(2), p. 293-309.
- Gentil, V. (2007). Corrosão. LTC – Livros Técnicos e Científicos, Editora: Rio de Janeiro.
- Gentil, V. (2011). Corrosão. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 584 p.
- Gentil, V. (2012). Corrosão. 6a ed. [s.l.] LTC - Livros Técnicos e Científicos.
- Gutner-Hoch, E., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Soares, A., Loureiro, S., Piller, C., Preiss, I., Weis, M., Larroze, S., Teixeira, T., Tedim, J., & Benayahu, Y. (2018). Antimacrofouling Efficacy of Innovative Inorganic Nanomaterials Loaded with Booster Biocides. *Journal of Marine Science and Engineering*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/jmse6010006>
- Ha, V. (1996) Manual of biocorrosion. CRC Press, London.
- Hartwell, S.I., Jordahl, D.M., Evans, J.E. May, E.B. (1995). Toxicity of aircraft de-icer and anti-icersolutions to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 14(8), p. 1375-1386.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton Jr., G.A., & Cairns Jr., J. (Eds.). (2002). Handbook of Ecotoxicology (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420032505>
- Hoseinzadeh E, Yusefzadeh A, Rahimi N, Khorsandi H. Evaluation of Corrosion andScaling Potential of a Water Treatment Plant. *Arch Hyg Sci* 2013;2(2):41-47.
- Jiang, P., Qiu, J., Gao, Y., Stefan, M. I., & Li, X.-F. (2020). Nontargeted Identification and Predicted Toxicity of New Byproducts Generated from UV Treatment of Water Containing Micropollutant 2-Mercaptobenzothiazole. *Water Research*, 116542. doi:10.1016/j.watres.2020.116542

- Kaczerewska, O., Martins, R., Figueiredo, J., Loureiro, S., & Tedim, J. (2020). Environmental behaviour and ecotoxicity of cationic surfactants towards marine organisms. *Journal of Hazardous Materials*, 122299. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122299
- Koch, G. *et al.* International Measures of Prevention, Application and economics of Corrosion Technologies Study. Nace International. Houston, p. 216. 2016.
- Kreyling, W.G. Semmler-Behnke, M.; Chaudhry, Q. A complementary definition of nanomaterial, *Nano Today* 5 (3) (2010) 165–168.
- Kurth, J. C., Krauss, P. D. & Foster, S. W. (2019). Corrosion Management of Maritime Infrastructure. *Transportation Research Record*, 2673(12), 2-14.
- Liao C., et al. (2018). A Review of Environmental Occurrence, Fate, Exposure, and Toxicity of Benzothiazoles. *Environmental Science and Technology*, 52, 5007–5026.
- Loza, K., Eppele, M., & Maskos, M. (2019). Stability of Nanoparticle Dispersions and Particle Agglomeration. *NanoScience and Technology*, 85–100. doi:10.1007/978-3-030-12461-8_4.
- Maia, F., Tedim, J., Lisenkov, A. D., Salak, A. N., Zheludkevich, M. L., & Ferreira, M. G. S. (2012). Silica nanocontainers for active corrosion protection. *Nanoscale*, 4(4), 1287. doi:10.1039/c2nr11536k
- Martins, R., Oliveira, T., Santos, C., Kuznetsova, A., Ferreira, V., Avelelas, F., ... Loureiro, S. (2017). Effects of a novel anticorrosion engineered nanomaterial on the bivalve *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science: Nano*, 4(5), 1064–1076. doi:10.1039/c6en00630b
- Mattson, E. (1989). Basic corrosion technology for scientists and engineers. Chapter 3.
- Mazumder, M.A.J. (2020). Global impact of corrosion: Occurrence, cost and mitigation.
- Medeiros, M.H.F. et al. (2002). Utilização do nitrito de sódio como inibidor de corrosão em estruturas de concreto armado sujeitas a ação dos íons cloretos. *Revista Engenharia Civil* (Universidade do Minho), Braga, v. 15, p. 19–28.
- Milanova, E., Ellis, S., & Sitholé, B. (2001). Aquatic toxicity and solution stability of two organic corrosion inhibitors: 2-mercaptobenzothiazole and 1,2,3-benzotriazole. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 16(3), 215–218. doi:10.3183/npprj-2001-16-03-p215-218
- Morais, W.R., da Silva, J.S., dos Santos Alves, G.F., da Silva, K.B., de Paiva, C.L., Zanta, S., Tonholo, J. (2018). Mapeamento Tecnológico e Científico de Novas Composições Inibidoras de Corrosão . *Cadernos de Prospeção*, v. 11(5), p. 1579- 1579.

- Nascimento, I. A., de Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. G. (2002). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria. 262 p.
- Nawrocki, S. T., Drake, K. D., Watson, C. F., Foster, G. D., & Maier, K. J. (2005). Comparative Aquatic Toxicity Evaluation of 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole and Selected Degradation Products Using *Ceriodaphnia dubia*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48(3), 344–350. doi:10.1007/s00244-004-0105-1
- Ohsawa, M. & Suëtaka, W. (1979). Spectro-electrochemical studies of the corrosion inhibition of copper by mercaptobenzothiazole. Corrosion Science. 19, 709-722.
- Palou, R. M., Olivares-Xomelt, O., & Likhanova, N. V. (2014). Environmentally friendly corrosion inhibitors. Developments in corrosion protection, 431-465.
- Perina, F., Ottoni, C., Santos, J., Santos, V., Silva, M., Campos, B., Fontes, M., Santana, D., Maia, F., Abessa, D., & Martins, R. (2023). Marine Hazard Assessment of Soluble and Nanostructured Forms of the Booster Biocide DCOIT in Tropical Waters. Water, 15(6), 1185. <https://doi.org/10.3390/w15061185>
- Poznyak S.K., et al. (2009). Novel Inorganic Host Layered Double Hydroxides Intercalated with Guest Organic Inhibitors for Anticorrosion Applications. ACS Applied Materials and Interfaces, 10, 2353–2362.
- Rani, B.E.A., Basu, B.B.J. (2012). Green inhibitors for corrosion protection of metals and alloys: an overview. International Journal of Corrosion, v. 2012, p. 1–15.
- 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.
- Reis Fo, R.W. & RESGALLA JR. C. 2002. Testes de toxicidade com embriões de *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Mytilidae): avaliações de indução e sensibilidade. Notas Téc.FACIMAR. 6:7-17.
- Roberge, P. R. (2008). Handbook of Corrosion Engineering. [s.l: s.n.].
- Santos, J. V. N. dos, Martins, R., Fontes, M. K., Campos, B. G. de, Silva, M. B. M. do P. e, Maia, F., Abessa, D. M. de S., & Perina, F. C. (2020). Can Encapsulation of the Biocide DCOIT Affect the Anti-Fouling Efficacy and Toxicity on Tropical Bivalves? Applied Sciences, 10(23), 8579. <https://doi.org/10.3390/app10238579>
- Sanyal, B. (1981). Organic Compounds as Corrosion Inhibitors in Different Environments - A Review. Progress in Organic Coatings, 9, 165–236.
- Shchukin, D.G. et al. (2008) Active Anticorrosion Coatings with Halloysite Nanocontainers. Journal of Physical Chemistry, p. 958–964.

- Spitzmüller, L., Nitschke, F., Rudolph, B. et al. Dissolution control and stability improvement of silica nanoparticles in aqueous media. *J Nanopart Res* 25, 40 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05688-4>.
- Tedim J., et al., (2010). Enhancement of Active Corrosion Protection via Combination of Inhibitor-Loaded Nanocontainers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(5), 1528–35.
- Tyas, M.J. (1978). In vitro toxicity tests of zinc phosphate cement. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 5(4), p. 339-347.
- Wu, F.-L., M. Hussein, W., P. Ross, B. & P. McGeary, R. (2012). 2-Mercaptobenzothiazole and its Derivatives: Syntheses, Reactions and Applications. *Current Organic Chemistry*, 16(13), 1555–1580.
- Wu, X., Wiame, F., Maurice, V. & Marcus, P. (2020). 2-Mercaptobenzothiazole corrosion inhibitor deposited at ultra-low pressure on model copper surfaces. *Corrosion Science*, 166(Janeiro), 108464.
- Zagatto, P.A & Bertoletti, E. (2006) *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações* 2 ed. São Paulo: Editora Rima. 478 p.
- Zaroni LP, Abessa DM, Lotufo GR, Sousa EC, Pinto YA. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Bull Environ Contam Toxicol*. 2005 Apr;74(4):793-800. doi: 10.1007/s00128-005-0651-x. PMID: 16094896.
- Zheludkevich M., et al. (2010). Active protection coatings with layered double hydroxide nanocontainers of corrosion inhibitor. *Corrosion Science*, 52, 602–611.
- Zheludkevich M., et al., TATA Steel. (2013). Patent number: WO 2013083293 A1. Application number: PCT/EP2012/005102. Publication date: Jun 13, 2013.

Anexo I
Valores dos parâmetros físico-químicos.

Teste Preliminar

MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	7,62	6,94	35	7,57	6,9	35
1,230	6,85	7,86	35	6,82	7,82	35
3,7	6,89	7,84	35	6,34	7,79	35
11,11	6,74	7,14	35	6,56	7,15	35
33,3	6,12	7,41	35	6,10	7,41	35
100	6,25	7,06	35	6,12	7,1	35

SiNC						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	6,53	7,97	35	6,4	7,9	35
0,137	6,4	8,01	35	6,38	7,95	35
0,41	6,41	8,04	35	6,25	8	35
1,23	6,34	8,05	35	6,38	8	35
3,7	6,45	8,05	35	6,3	8,1	35
11,1	6,44	7,85	35	6,45	7,96	35

SiNC MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	6,52	7,95	35	6,5	8,1	35
0,1370	6,52	7,99	35	6,47	7,94	35
0,410	6,38	8,01	35	6,4	8	35
3,7	6,43	8,04	35	6,35	8,2	35
11,11	6,48	8,04	35	6,3	8,16	35
33,33	6,7	8,06	35	6,5	8	35

Teste 1

MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	7,62	6,94	35	8,25	8,28	35
1,230	6,85	7,86	35	7,8	8,22	35
3,7	6,89	7,84	35	7,1	8,67	35
11,11	6,74	7,14	35	7,6	8,5	35
33,3	6,12	7,41	35	7,84	8,56	35
100	6,25	7,06	35	7,49	8,29	35

SiNC						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	7,52	8,47	35	7,45	8,34	35
0,137	7,4	8,52	35	7,8	8,33	35
0,41	7,43	8,55	35	7,7	8,54	35
1,23	7,33	8,53	35	7,4	8,64	35
3,7	7,35	8,41	35	7,56	8,47	35
11,1	7,46	8,52	35	7,48	8,36	35

SiNC MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	7,2	8,14	35	8,2	8,07	35
0,1370	7,22	8,76	35	7,9	8,67	35
0,410	7,14	8,46	35	7,7	8,81	35
3,7	7,18	8,32	35	7,65	8,54	35
11,11	7,2	8,37	35	7,58	8,4	35
33,33	7,17	8,4	35	7,1	8,3	35

Teste 2

MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0	7,77	8,14	35	7,57	8,5	35
1,230	7,57	8,76	35	7,8	7,82	35
3,7	7,44	8,46	35	7,1	8,47	35
11,11	7,45	8,32	35	7,6	7,96	35
33,3	7,84	8,14	35	7,84	8,22	35
100	7,45	8,36	35	7,69	8,67	35

SiNC						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0			35	7,45	8,34	35
0,137			35	7,8	8,34	35
0,41			35	7,7	8,33	35
1,23			35	7,9	8,64	35
3,7			35	7,7	8,54	35
11,1			35	7,64	8,62	35

SINC MBT						
Inicial				Final		
Concentração	OD	pH	Salinidade	OD	pH	Salinidade
0			35	8,14	8,07	35
0,1370			35	8,20	8,67	35
0,410			35	7,9	8,81	35
3,7			35	7,7	8,55	35
11,11			35	7,65	8,46	35
33,33			35	7,78	8,54	35

Anexo II
Substância de referência.

Teste	CI ₅₀ obtido em mg/L	CI ₅₀ de referência (DEL CIELO, 2013)
Preliminar	0,96 (0,92 – 0,98)	
Primeiro	1 (0,97 – 1,1)	0,98 – 2,03 mg/L
Segundo	0,9 (0,8 – 1,1)	

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: CAMILA PRIETO MARTINS

Título: "AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO INIBIDOR DE CORROSÃO 2-MERCAPTOBENZOTIAZOL (MBT), EM SUA FORMA LIVRE E NANOENCAPSULADA (SiNC), SOBRE EMBRIÕES DE PERNA PERNA (LINNAEUS 1758)."

Orientador: Dr. Caio Cesar Ribeiro

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Dr. Caio Cesar Ribeiro	Aprovado
Msc. Maysa Ueda	Aprovado

PARECER:

A aluna apresentou aptidão na apresentação e no desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Camila Prieto Martins** obteve o seguinte conceito:

☒

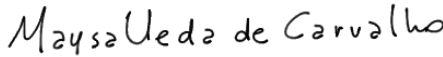
APROVADO

☐

REPROVADO

São Vicente, 12 de dezembro de 2024.


Dr. Caio Cesar Ribeiro:


Msc. Maysa Ueda de Carvalho