

**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*)**

Isabella Beverari Couto

São Vicente
2023

Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/no - CEP 11330-900 - São Vicente (SP) - Brasil
Tel. (13) 3569-7100

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DO LITORAL PAULISTA

Isabella Beverari Couto

**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*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da UNESP – Campus do Litoral Paulista para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, modalidade Gerenciamento Costeiro.

Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente

2023

B571a Beverari, Isabella

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*) /
Isabella Beverari. -- São Vicente, 2023

32 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Denis Moledo de Souza Abessa

1. Ecotoxicologia. 2. Toxicidade. 3. Anticorrosivos. 4. Nanomateriais. 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 a minha família, principalmente meus pais Gabriela e Nilton pelo apoio durante toda essa trajetória, assim como todo o suporte necessário, sem vocês isso não seria possível. Meu avô Jurandir por estar sempre presente e me lembrar das coisas simples. E uma homenagem a minha avó Marile, você sempre será meu exemplo, minha maior saudade e o meu maior amor no mundo, te amo infinitamente. A Bibia, que você saiba que pode conquistar tudo que deseja.

Segundamente meu namorado Vinícius, que continua me lembrando de ser forte, além de me acompanhar durante toda essa etapa me manteve firme e confiante de que eu conseguiria, você nunca me deixou desistir, me fez rir no piores momentos, me lembrou de sonhar e me deixa ser eu mesma, te amo.

As minhas melhores amigas: Deep e Drica, por serem o melhor trio que eu poderia desejar no mundo, espero retribuir pelo menos um pouquinho do vocês fazem por mim, eu sempre estarei aqui para vocês. Ao “Grupinho Bom” (Deep, Drica, Dinha, Conso e Dezza) eu prometo nunca esquecer de todos os nossos momentos, espero passar a vida comemorando as conquistas de cada uma de vocês. Ao Catu e o Mongo por todo o carinho, vocês fazem a diferença na minha vida. A minha filhota Brenda, que você se lembre que sempre terá um lugar no meu coração. A Manu, ao Natasha, a Trem e Papa a vida é mais leve quando estamos juntos.

Ao meu orientador Denis, que desde o primeiro dia no laboratório me deu liberdade para ser a pesquisadora que eu gostaria, sou muito grata pela oportunidade de trabalhar com você, obrigada por todo o aprendizado. A Guacira e Carol, que praticamente foram os pilares desse trabalho, fizeram tanto por mim que não tenho palavras para agradecer, além de se tornarem grandes amigas. Espero ser que nem vocês quando crescer. Ao NEPEA, pelas pessoas que dividem as dificuldades diárias, principalmente, Magda, Malabares, Bussola e Konga, pelas risadas, pelas louças lavadas e por todo o conhecimento que vocês me transmitem diariamente. Um destaque para Xêpa, que me aguenta todos os dias, mas a gente ri e fofoca acima de tudo, você é incrível.

A minha turma, XVI, pelos cinco anos que passamos juntos, por todos os momentos de alegria e tristeza, eu não poderia fazer parte de uma turma melhor, lembrarei de cada um.

Por fim, a CNPq pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Índice

1. Introdução.....	7
2. Materiais e Métodos.....	12
2.1 Organismo-teste.....	12
2.2 Preparo das Soluções-teste.....	13
2.3 Ensaio de Desenvolvimento Embrionarval.....	15
2.4 Análise estatística.....	16
3. Resultados	17
3.1 Resultados preliminares.....	17
3.2 Resultados definitivos.....	20
4. Discussão.....	22
5. Conclusão.....	24
6. Referências Bibliográficas	25
7. Anexo I.....	31
8. Anexo II.....	32

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*)

RESUMO

O processo de corrosão é um dos grandes desafios da atualidade, principalmente em estruturas e equipamentos no ambiente marinho, sendo uma questão econômica, social e ambiental. Esse problema tem sido minimizado pela aplicação de revestimentos que retardam o processo de corrosão. No entanto, devido a toxicidade investigada de inibidores de corrosão (IC) e regulamentações ambientais mais rigorosas, há a necessidade de novas alternativas eficazes e menos tóxicas. Recentemente, os inibidores orgânicos, gluconato de sódio e nitrito de sódio, já estudados como inibidores de corrosão, tornaram-se opções ambientalmente amigáveis. O uso de nanomateriais, formados de hidróxidos de dupla camada (LDH) para imobilização/encapsulamento dos ICs, visa aumentar a eficiência anticorrosiva dessas substâncias e reduzir sua toxicidade, já que sua liberação é controlada pelas características físico-químicas da água do mar. Neste projeto foi feita avaliação ecotoxicológica do SG e NO₂, nas formas livres e nanoestruturadas (Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH NO₂), através de ensaios de desenvolvimento embriolarval de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. Para isso, organismos adultos de *E. lucunter* foram coletados e em laboratório foi feita a obtenção dos gametas. Os embriões de ouriços foram expostos a concentrações que variaram de 0,0136 a 100 mg/L, bem como no controle contendo 4 réplicas por concentração. Após cerca de 36 h, os embriões foram fixados e posteriormente contados em microscópio, visando analisar a taxa de desenvolvimento normal da larva em estágio plúteo. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância, seguida do teste de Dunnett e determinação da CE₅₀. A taxa de desenvolvimento embriolarval para ouriços-do-mar *E. lucunter* apresentou os seguintes níveis de toxicidade: Zn-Al LDH NO₂ > Zn-Al LDH SG > SG > Zn-Al LDH > NO₂, com as respectivas CE₅₀: 0.41; 0.67; 1.21; 6.24 mg/L. Não foi possível calcular a CE₅₀ do NO₂. Dentre os compostos testados, NO₂ livre apresentou menor toxicidade e sua forma nanoencapsulada maior toxicidade. Portanto, os resultados indicaram a toxicidade dos compostos livres e nanoencapsulados e evidenciam que o uso de inibidores de corrosão necessitam de mais estudos acerca da sua toxicidade, destacando a relevância desse estudo.

Palavras-chaves: ecotoxicologia; toxicidade; anticorrosivos; nanomateriais

Abstract

The corrosion process is one of today's great challenges, especially in structures and equipment in the marine environment, being an economic, social and environmental issue. This problem has been minimized by the application of coatings that slow down the corrosion process. However, due to the investigated toxicity of corrosion inhibitors (CI) and stricter environmental regulations, there is a need for new effective and less toxic alternatives. Recently, organic inhibitors, sodium gluconate and sodium nitrite, already studied as corrosion inhibitors, have become environmentally friendly options. The use of nanomaterials, formed of double layer hydroxides (LDH) for immobilization/encapsulation of the ICs, aims to increase the anticorrosion efficiency of these substances and reduce their toxicity, since their release is controlled by the physicochemical characteristics of the seawater. In this project, an ecotoxicological evaluation of SG and NO₂, in free and nanostructured forms (Zn-Al LDH SG and Zn-Al LDH NO₂), was performed using embryolarval development assays with the sea urchin *Echinometra lucunter*. Adult organisms of *E. lucunter* were collected and gametes were obtained in the laboratory. The urchin embryos were exposed to concentrations ranging from 0.0136 to 100 mg/L, as well as the negative control (clean sea water). 4 replicates were used for each concentration. After about 36 h, the embryos were fixed and counted under a microscope, in order to quantify the normal development rate. The results were analyzed by analysis of variance, followed by Dunnett's test and determination of the EC50. The embryolarval development rate for *E. lucunter* showed the following toxicity levels: Zn-Al LDH NO₂ > Zn-Al LDH SG > SG > Zn-Al LDH > NO₂, with the EC50: 0.41; 0.67; 1.21; 6.24 mg/L. It was not possible to calculate the EC50 for the NO₂. Among the tested compounds free NO₂ showed lower toxicity and its nanoencapsulated form higher toxicity. The toxicity of the nanoengineered materials (empty or containing the ICs) was higher than the free compounds, possibly due to the metals release. Thus, the development of new corrosion inhibitors requires further studies on the environmental risks.

Keywords: ecotoxicology; toxicity; anticorrosives; nanomaterials.

1. Introdução

Em um cenário global de mudanças ambientais, a busca pelo equilíbrio entre o crescimento econômico e a preservação do meio ambiente, visa solucionar os desafios da atualidade, sendo um deles a corrosão. Segundo a norma ISO 8044/1986 (*International Organization for Standardization*), o processo de corrosão consiste na deterioração das estruturas metálicas pela interação físico-química entre os metais e o ambiente do qual fazem parte (Mattson, 1989), associada ou não a esforços mecânicos (Gentil, 2012), e levando em consideração a perda das suas propriedades originais (Morais *et al.*, 2018). Estruturas metálicas são manejadas para uso nas indústrias e bens de consumo, sendo transformadas em sua forma metálica termodinamicamente instável, e quando expostas a condições corrosivas tais metais tendem a reverter ao seu estado originalmente encontrado na natureza (Roberge, 2008). Do ponto de vista químico, a corrosão pode ser observada como a reversão química do metal refinado ao seu estado de energia mais estável (Há, 1996; Mazumder, 2020).

Esta deterioração resulta em prejuízos em diversos aspectos, afetando a durabilidade e desempenho dos materiais, que deixam de satisfazer os fins para os quais se destinam, tais como desgaste, transformações químicas ou modificações estruturais (Frauches-Santos *et al.*, 2014). O reparo dos materiais afetados pela corrosão demanda recursos econômicos, caso contrário esse processo pode ocasionar problemas nas mais variadas atividades, como por exemplo, nas indústrias químicas, navais e petrolíferas; estruturas *offshore*; nos meios de transportes; na medicina; entre outros (Gentil, 2007). Segundo Jayaherdashti (2000), o custo típico gerado pela manutenção de problemas relacionados à corrosão varia de 1 a 5 % do Produto Nacional Bruto (PNB). Em similaridade, um estudo realizado pela *National Association of Corrosion Engineers* (NACE), aponta que entre 2013 e 2015, os custos globais relacionados à 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).

Os métodos de proteção contra a corrosão incluem revestimentos (tintas) com a aplicação de proteção anódica e catódica, que formam uma película sobre a estrutura metálica, gerando uma barreira física e química (Frauches-Santos *et al.*, 2014). Os principais requisitos de um revestimento são: baixa permeabilidade, resistência química ao meio agressivo, dilatação térmica compatível com o substrato e propriedades físicas adequadas (Montemor, 2014). Em estruturas *offshore* um dos problemas mais sérios é a falha dos mecanismos de proteção à corrosão, já que as propriedades dos materiais

metálicos no ambiente marinho degradam-se ao longo do tempo devido à erosão causada por múltiplos fatores, simultaneamente (Cai *et al.*, 2020). Esses fatores incluem: oxigênio dissolvido (OD), temperatura, salinidade, pH, velocidade do vento, entre outros (Cai *et al.*, 2020). Além disso, a taxa de corrosão pode variar e ou ainda ser acelerada por oscilações desses fatores, como por exemplo, o aumento da temperatura e da pressão (Frauches-Santos *et al.*, 2014).

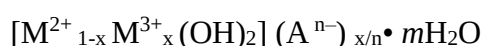
Atualmente, a aplicação de revestimentos protetores é a abordagem mais comum para a proteção contra a corrosão. Nesse sentido, é pertinente buscar novas tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente amigáveis, com o objetivo de melhorar especificidades do material e sua interação com o ambiente. 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).

Os ICs podem ser classificados pela sua composição: orgânica ou inorgânica; ou pela sua ação: catódicos, anódicos, mistos, 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), 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).

Os ICs orgânicos, que 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). No entanto, estudos têm demonstrado que estes compostos também produzem efeitos tóxicos indesejados em espécies não-alvo (Tornero & Hanke, 2016; Figueiredo *et al.*, 2019). Como consequência, órgãos ambientais impuseram normas e regulamentações para o uso e descarte de ICs, considerando que alguns estudos demonstraram a ecotoxicidade dos compostos, apesar da biodegradabilidade e a eficiência (Sastri, 2011).

Recentemente, a imobilização-encapsulamento de compostos para inibidores de corrosão tem sido testada através do uso de nanomateriais, com a proposta de controlar a sua liberação ao longo do tempo (Martins *et al.*, 2017). Outras vantagens seriam: reduzir o impacto do composto no ambiente marinho, garantir a estabilidade e durabilidade dos revestimentos, e principalmente, não apresentar risco para o ecossistema marinho (Figueiredo *et al.*, 2019; Hoch *et al.*, 2019).

Um tipo de partícula possível de ser utilizada para este fim são os Hidróxidos Duplos Lamelares (LDH). O LDH é uma classe de nanoargilas aniônicas, com um tamanho lateral variando de 20 a 40 nm, alta área de superfície específica e estabilidade química melhorada (Tedim *et al.*, 2010; Hoch *et al.*, 2019). Estes consistem em camadas de hidróxidos positivamente carregados com ânions e moléculas de água intercaladas entre as camadas. Devido a sua estrutura, é possível aprisionar entre as lamelas inibidores de corrosão em sua forma aniônica, de maneira que a liberação destes é desencadeada pela troca iônica com íons de cloreto no meio corrosivo (Hang *et al.*, 2012). Resumindo, o LDH funciona como um reservatório, no qual as espécies funcionais (neste caso, os IC) são armazenadas e permanecem por um maior período, até que sejam degradadas (Montemor, 2014) (Figura 1). Os hidróxidos duplos lamelares podem ser representados pela fórmula geral:



M^{2+} representa um cátion metálico divalente (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} ...)

M^{3+} representa um cátion metálico trivalente (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} ...)

A^{n-} representa um ânion intercalado de carga n^-

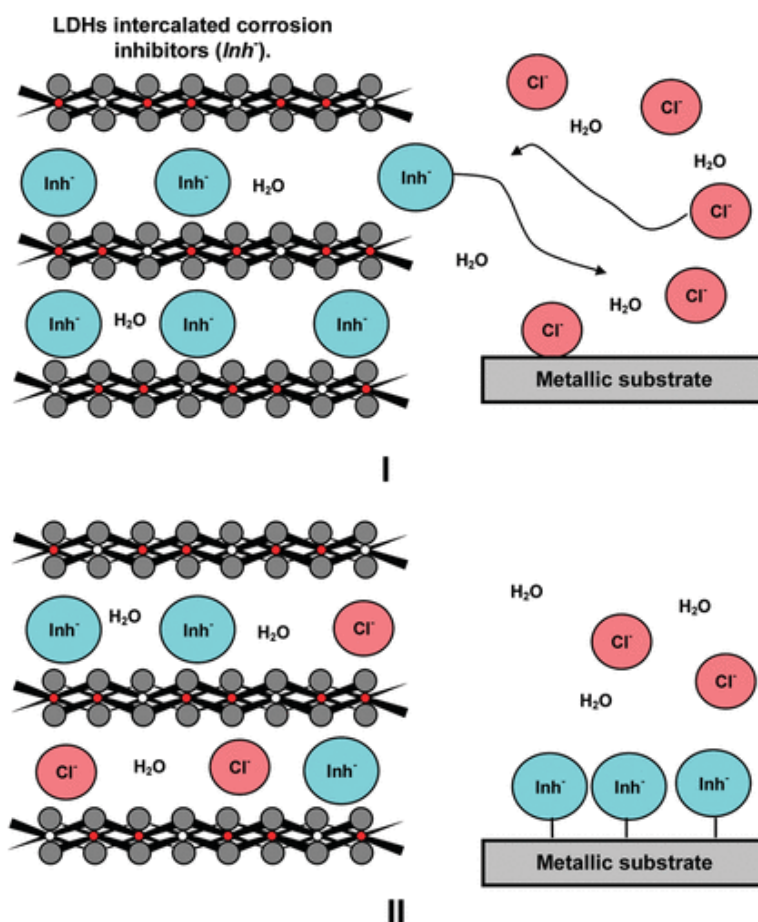


Figura 1. Visão esquemática da ação dos LDHs na proteção anticorrosiva. Em I a liberação dos inibidores (Inh⁻) é desencadeada pela presença de ânions em solução (Cl⁻). Em II os LDHs desempenham um papel duplo, fornecendo inibidores para proteger os substratos metálicos e aprisionando as espécies agressivas do ambiente. Fonte: Tedim *et al.* (2010).

Este tema é parte dos objetivos propostos pelo 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). Esse projeto é coordenado pelo Dr. Roberto Martins, da Universidade de Aveiro, em parceria com nosso grupo de pesquisa, e busca estudar os riscos ambientais da aplicação de novos nanomateriais com finalidade anticorrosiva.

Dentre os ICs existentes, o gluconato de sódio (SG) contém um grupo carboxila e cinco outros grupos hidroxila, sendo derivado do ácido glutâmico e considerado um inibidor de corrosão orgânico efetivo. Estudos indicaram 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 SG age como um inibidor misto,

inibindo os processos de corrosão anódicos e catódicos, mesmo tendo mais efeito sobre os anódicos. 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, retardando a corrosão (Li *et al.*, 2015).

O nitrito de sódio (NO₂) também é um inibidor orgânico muito utilizado em diversas indústrias, principalmente pela sua alta eficiência e baixo custo. O NO₂ age como um inibidor aniônico, através da dissolução metálica e consequente redução da taxa de corrosão (Resende *et al.*, 2018). Seu mecanismo de inibição ocorre quando dois íons de nitritos competem com os íons de cloretos, oxidando o íon ferroso e gerando uma camada de óxido férrico, que atua como uma camada protetora (Bolzoni *et al.*, 2022).

A integração da nanoestrutura do LDH com os ICs visa minimizar a ação dos compostos potencialmente tóxicos, já que o encapsulamento previne a interação dos ICs com outros componentes das tintas, além da tecnologia de liberação controlada que ocorre em resposta às alterações do ambiente (exemplo da presença de cloretos e mudança de pH) (Tedim *et al.*, 2010; Zheludkevich *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012). O uso dos nanomateriais pode exercer um papel importante na redução do impacto ambiental como demonstrado por Tayemeh *et al.* (2020) em nanopartículas de prata e Figueiredo *et al.* (2019) & Santos *et al.* (2020) no encapsulamento do biocida anti-incrustante DCOIT. Esses compostos inovadores destinados às aplicações marinhas necessitam ser testados em termos de toxicidade em relação aos organismos marinhos neotropicais e subtropicais, antes de serem efetivamente introduzidos no mercado.

Os ensaios ecotoxicológicos podem detectar ou estimar os efeitos biológicos associados à ocorrência de estressores, dos quais destacam-se os testes de toxicidade crônico (Abessa, 2016). Estes testes permitem identificar concentrações ambientais capazes de promover alterações na biota marinha e assim tornar viáveis ações que solucionam ou diminuem os impactos gerados pelas substâncias potencialmente tóxicas (Barros *et al.*, 2019). Testes de toxicidade envolvendo às diferentes respostas dos organismos frente aos agentes tóxicos vêm sendo realizados com organismos considerados bioindicadores (Adams & Greenley, 2000, ou seja, aqueles organismos que são utilizados como indicadores dos primeiros efeitos da contaminação de um habitat.

Estudos têm demonstrado que embriões de equinodermos, mais especificamente ouriços-do-mar, são excelentes bioindicadores por se apresentarem sensíveis a

contaminantes exógenos (Dinnel *et al.*, 1989; Regalla *et al.*, 2002). Nesse sentido, testes de toxicidade analisando o desenvolvimento embriolarval de ouriços-do-mar têm sido amplamente utilizados no mundo em avaliações de risco ambiental em decorrência de sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas (Bellas, 2008; Perina *et al.*, 2011; Soares & Resgalla, 2011).

O presente trabalho possui caráter inédito e inovador, tendo rápida aplicação prática, pois visa avaliar os efeitos da exposição do gluconato de sódio e nitrito de sódio, em suas formas livre e nanoestruturadas (LDH-SG e LDH NO₂), sobre o desenvolvimento embrionário de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*.

Com base nessas informações, as seguintes hipóteses são levantadas:

- 1) Os ICs orgânicos gluconato de sódio e nitrito de sódio apresentam reduzida toxicidade para embriões de *E. lucunter*.
- 2) O encapsulamento desses não altera a toxicidade sobre embriões de *E. lucunter*, em comparação com os compostos livres.

2. Materiais e Métodos

2.1. Organismo-teste

Ouriços-do-mar da espécies *E. lucunter* (Linneaus, 1758) são invertebrados pertencentes a família Echinometridae (Figura 2). São organismos exclusivamente marinhos, de característica bentônica e habitando regiões tropicais e subtropicais (ABNT, 2012), podendo ser encontrados em quase todo o litoral brasileiro em regiões rochosas (Caetano, 2018). Possuem corpo globoso, simetria radial e pouca mobilidade, apresentam espinhos móveis de tamanho variados, presos a carapaça rígida de calcário (Caetano, 2018). Devido seu potencial bioerosivo, sua atuação na ciclagem de nutrientes e sua alimentação baseada em algas e pequenos bentos, demonstram grande importância na cadeia trófica ao controlarem essas populações (Lawrance, 1975). Em relação à reprodução, *E. lucunter* não apresenta dimorfismo sexual evidente, sua fecundação é externa e seu desenvolvimento é indireto, com formação de diferentes fases de desenvolvimento larval, incluindo estágio de equino-plúteos (Smith *et al.*, 2008; Hendler *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2012).

Embriões de ouriços-do-mar são considerados bioindicadores em ensaios de toxicidade crônica de curta duração, uma vez que estas espécies possuem ampla distribuição geográfica, são abundantes, de fácil manipulação e coleta, facilidade na

obtenção de gametas e na realização de fecundação *in vitro*, tornando-o excelente no processo de avaliação de risco ambiental (Bonfim, 2005). As fases embrionária e larval têm sido utilizadas em testes de toxicidade para avaliar a qualidade do ambiente marinho (Mastroti, 2002), devido sua sensibilidade, acessibilidade e rapidez dos resultados de exposição, além da confiabilidade dos resultados (Cruz, 2001; USEPA, 2002; Zagatto & Bertoletti, 2008; Environment Canada, 2011).



Figura 2. *Echinometra lucunter*. Fonte: Dra. Ana Carolina Feitosa Cruz.

2.2. Preparo das Soluções-teste

Para o preparo das soluções-teste utilizou-se água do mar reconstituída, sendo preparada com o sal marinho *Red Sea Salt* e filtrada em membrana de 0,45 μm , com a salinidade definida a 35, de acordo com os requerimentos de *E. lucunter* (Prósperi & Araújo, 2002).

As soluções estoques foram preparadas com os compostos livres: Gluconato de

Sódio (SG) e Nitrito de Sódio (NO_2); os compostos imobilizados em hidróxidos duplos lamelares: Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH NO_2 ; e o nanomaterial descarregado Zn-Al LDH. A análise do nanomaterial na ausência dos compostos livres ocorre pela necessidade de averiguar sua toxicidade específica.

De modo a obter soluções-estoque à 100 mg/L, pesou-se 0,01 g para SG, NO_2 e Zn-Al LDH. De modo a utilizar concentrações equivalentes para todas as soluções, foi necessário considerar apenas 32,2% do peso total de Zn-Al LDH SG, ou seja, 0,310 g e 25% do peso total de Zn-Al LDH NO_2 , ou seja, 0,4 g. Este peso corresponde ao inibidor de corrosão imobilizado, isto é, o equivalente ao teor anticorrosivo imobilizado no peso seco dos nanomateriais (Figueiredo *et al.*, 2019). As soluções-estoque foram colocadas em banho ultrassônico à 40 kHz para garantir sua homogeneidade, por no máximo 30 minutos, evitando o aumento da temperatura e a degradação dos compostos (Figueiredo *et al.*, 2019). Imediatamente após o banho ultrassônico, foram preparadas as concentrações de exposição.

Foram realizados dois ensaios preliminares, no quais as concentrações de exposição foram definidas considerando um gradiente e adotando um fator de diluição 3 ($\text{FT} = 3$). No primeiro teste SG, Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH tiveram as seguintes concentrações testadas: 1.23, 3.70, 11.1, 33.3 e 100 mg/L. No segundo teste, as concentrações analisadas para SG e Zn-Al LDH SG: 0.015, 0.0136, 0.41 e 1.23 mg/L; para NO_2 e Zn-Al LDH NO_2 : 0.136, 0.41, 1.23, 3.70, 11.1 e 33.3 mg/L; e para Zn-Al LDH: 0.015, 0.0136, 0.41, 1.23, 3.70, 11.1 e 33.3 mg/L.

Os resultados obtidos determinaram as concentrações, em mg/L, utilizadas no teste definitivo. As concentrações foram para SG e Zn-Al LDH SG: 0.0136, 0.41, 1.23, 3.70, 11.1 e 33.3; para NO_2 e Zn-Al LDH NO_2 : 0.41, 1.23, 3.70, 11.1, 33.3 e 100; e para Zn-Al LDH: 0.0136, 0.41, 1.23, 3.70, 11.1, 33.3 e 100. A partir das soluções-teste com as concentrações, foram preparadas 4 réplicas por concentração em tubos de ensaio contendo volume de 10 ml de solução, além das réplicas de controle, que continham apenas água do mar reconstituída.

Para avaliar a sensibilidade dos organismos-teste foi escolhida como substância de referência o detergente Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) (Soares & Resgalla Junior, 2016), de modo a confirmar a faixa de sensibilidade dos embriões (Carr & Belanger, 2019). Foi pesado 0,01 g desta substância, visando gerar uma solução estoque de 100 mg/L e as cinco concentrações utilizadas foram de 0.5, 1, 2, 3, 5 (mg/L).

2.3. Ensaio de Desenvolvimento Embrionário

Os testes de toxicidade crônica de curta duração de desenvolvimento embrionário com ovos recém fecundados de *E. lucunter*, foi determinado pelo protocolo descrito pela norma ABNT/NBR 15350 (ABNT, 2012). O método fundamenta-se na obtenção de gametas, na fertilização artificial e na determinação do número de embriões normais e anormais, após o período de exposição (Mello *et al.*, 2020).

Os ouriços-do-mar adultos foram coletados em costões rochosos, na Ilha das Palmas, Guarujá (SP). Estes foram dispostos em caixas térmicas, sem adição de água e rapidamente foram transportados para o laboratório de Ecotoxicologia Professor Caetano Belliboni (Lecotox), da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), onde foram mantidos sob condições controladas, com adição de água do mar e aeração constante, para aclimação.

A obtenção dos gametas foi induzida por choque osmótico pela injeção de 2,5 ml de KCl (0,5 M) na região perioral do ouriço, em pontos diametralmente opostos. Os óvulos foram coletados em béqueres de 500 ml contendo água do mar filtrada. Em seguida, os óvulos decantaram, foram filtrados em malha de 150 µm para a retenção de detritos, homogeneizados e lavados três vezes (Nascimento *et al.*, 2002), e posteriormente observados em microscópio para a garantia da sua viabilidade. O esperma foi coletado com o auxílio de um conta-gotas e acondicionado em um béquer de 50 ml sem a presença de água do mar e mantidos refrigerados até o momento de sua utilização. A coleta de gametas ocorreu com no mínimo três machos e três fêmeas para garantir a variabilidade genética (ABNT, 2012).

Na fecundação, 0,5 ml de esperma foi diluído em 24,5 ml de água do mar, e 1-2 ml desta solução espermática foram adicionados aos óvulos, sendo mantidos em agitação leve e constante por duas horas. Após esse processo, alíquotas de embriões foram examinadas em microscópio para confirmar a viabilidade dos embriões através da identificação da membrana de fertilização e início do processo de divisão celular (Enviroment Canada, 1992). Em seguida, cerca de 300 a 500 embriões recém-fecundados foram introduzidos às réplicas. Os testes foram mantidos em câmara incubadora por um período de 36 h, na temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro) (ABNT, 2020). Ao final, 0,5 ml de Formol 10% tamponado foi adicionado a cada réplica, de modo a interromper o desenvolvimento embrionário e preservar os organismos. Os parâmetros físico-químicos (salinidade, oxigênio dissolvido e pH) foram medidos no início e no fim do teste (Anexo I).

A leitura dos resultados consistiu na observação dos 100 primeiros embriões obtidos em subamostras de cada réplica, com o auxílio da câmara de *Sedgwick-Rafter*, contabilizando o desenvolvimento normal (Figura 3) e desenvolvimento anormal, considerado como os estágios anteriores à larva plúteo, atraso no desenvolvimento e organismos deformados (Figura 4). Para certificar a confiabilidade do ensaio, no grupo controle, os embriões alcançaram uma taxa de, pelo menos, 80% de desenvolvimento normal (ABNT, 2012; Environment Canada, 1992).

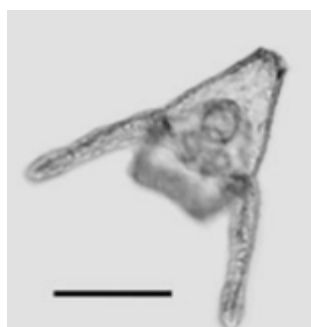


Figura 3. Desenvolvimento normal da larva plúteo de equinodermos. Fonte: Perina *et al.*, 2011.

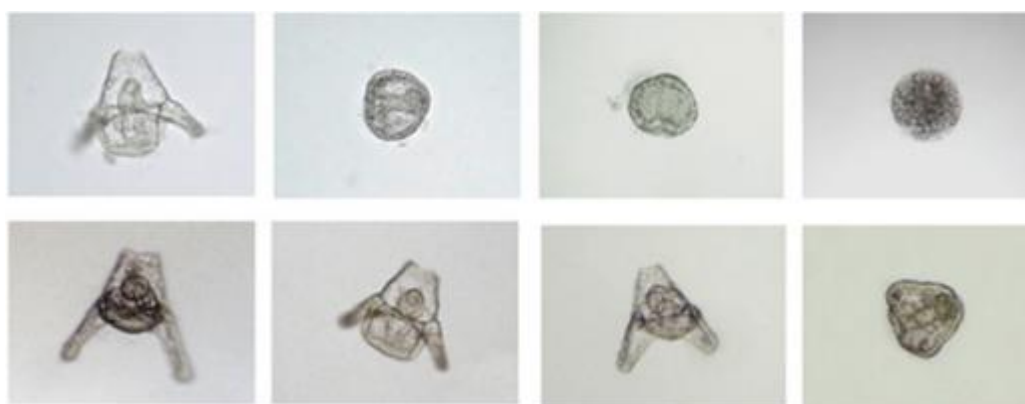


Figura 4. Desenvolvimento anormal em diferentes estágios da larva plúteo de equinodermos. Fonte: Perina *et al.*, 2011.

2.4. Análises Estatísticas

Os resultados do teste de toxicidade crônica foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene), respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$), ou equivalentes não paramétricos, 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).

O cálculo da Concentração de Efeito para 50% dos organismos (CE_{50}) foi analisado

por 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%. Os resultados foram analisados usando o *software* GraphPad Prism V.5.

3. Resultados

3.1 Resultados Preliminares

O desenvolvimento embriolarval de *E. lucunter* foi analisado utilizando a Concentração de Efeito Observado (CEO), a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito para 50% dos organismos (CE_{50}).

O primeiro ensaio preliminar foi realizado apenas com o SG, Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH. Os valores foram apresentados na Tabela 1. Os gráficos de comparação com o controle estão na Figura 5. No que se refere ao composto livre, não foi possível calcular a CE_{50} , uma vez que houve mais de uma concentração que causou efeito a 50% dos organismos, e todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). Em relação ao composto nanoestruturado, Zn-Al LDH SG apresentou diferença significativa em relação ao controle para todas as concentrações, com uma CE_{50} de 0,18 mg/L. Nas concentrações de 11.1, 33.3 e 100 mg/L houve 100% de desenvolvimento anormal. A nanocápsula descarregada, apresentou diferença significativa em relação controle a partir da concentração de 11.1 mg/L (CEO), exibindo uma CE_{50} de 13,78 mg/L. Nas concentrações de 33.3 e 100 mg/L houve 100% de desenvolvimento anormal.

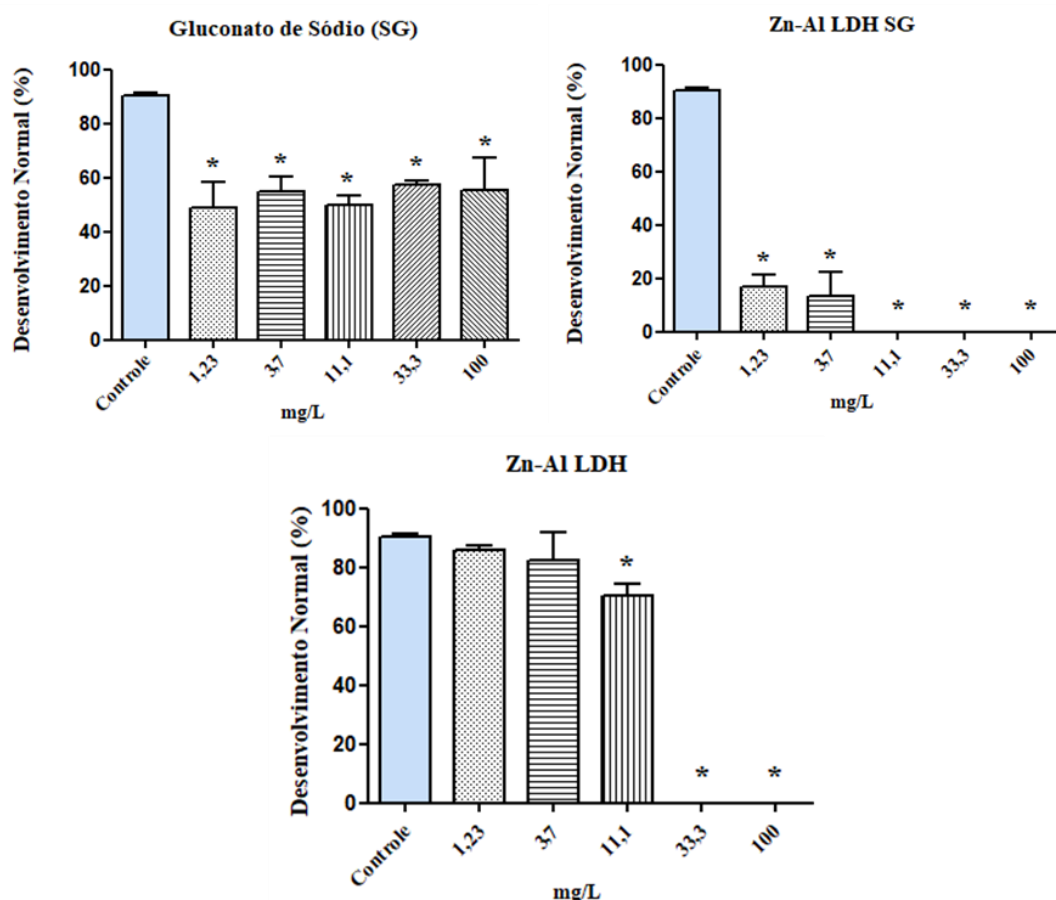


Figura 5. Ensaio preliminar do desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares, Zn- Al LDH, SG livre e imobilizado Zn-Al LDH SG. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 1. Resultados preliminares dos testes ecotoxicológicos de desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*, em mg/L, indicando os fatores: Concentração de Efeito Observado (CEO); Concentração de Efeito Não Observado (CENO); e Concentração Efetiva para 50% dos organismos (CE_{50}) e seus intervalos de confiança (IC);

Composto	CEO	CENO	$CE_{50} (\pm IC - 95\%)$
SG	1,23	>1,23	-
Zn-Al LDH SG	1,23	>1,23	0,1809 (0.04499 – 0.7272)
Zn-Al LDH	11,1	3,70	13,78 (11.13 – 17.06)

O segundo ensaio preliminar foi realizado com todos os compostos. Os valores foram apresentados na Tabela 2 e os gráficos de comparação com o controle estão na Figura 6. Em relação aos compostos livres SG e NO_2 , todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) e não foi possível calcular as CE_{50} , já que nenhuma das concentrações apresentou efeito a 50% dos organismos. Para os compostos nanoestruturados, Zn-Al LDH SG apresentou diferença significativa em relação ao controle a partir da concentração de 0,41 mg/L (CEO) e não

foi possível calcular a CE_{50} ; enquanto para Zn-Al LDH NO_2 , todas as concentrações apresentaram diferença significativa em relação ao controle e uma CE_{50} de 1,555 mg/L, nas concentrações de 11.1 e 33.3 mg/L houve 100% de desenvolvimento anormal. A nanocápsula descarregada apresentou diferença significativa em relação ao controle a partir da concentração de 0,41 mg/L (CE_{50} de 4,047 mg/L e na concentração de 33.3 mg/L houve 100% de desenvolvimento anormal.

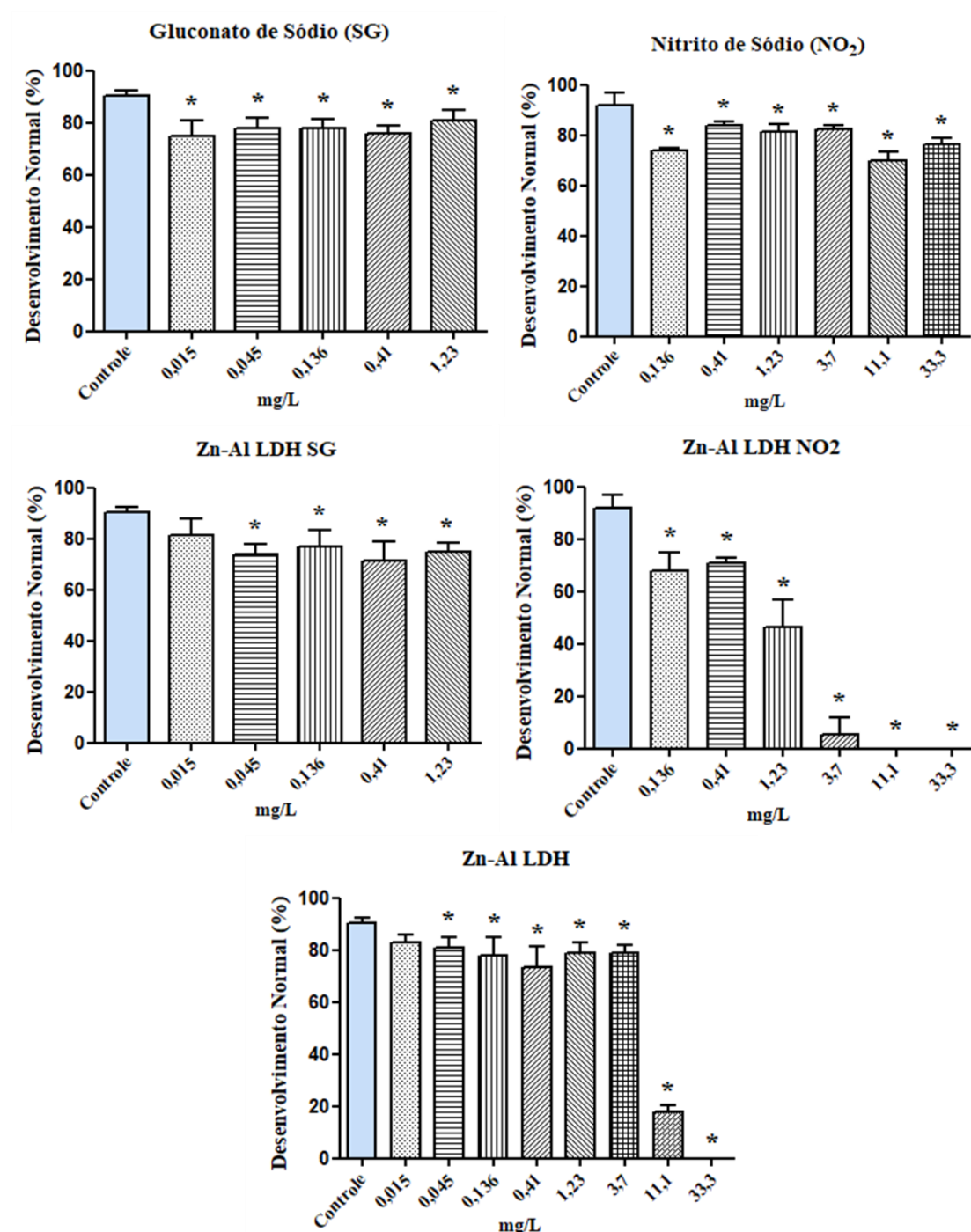


Figura 6. Ensaio preliminar do desenvolvimento embriolar do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*

exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares, Zn- Al LDH, SG e NO₂ livre e imobilizado Zn- Al LDH SG e Zn-Al LDH NO₂. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 2. Resultados preliminares dos testes ecotoxicológicos de desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*, em mg/L, indicando os fatores: Concentração de Efeito Observado (CEO); Concentração de Efeito Não Observado (CENO); e Concentração Efetiva para 50% dos organismos (CE₅₀) e seus intervalos de confiança (IC);

Composto	CEO	CENO	CE ₅₀ (± IC - 95%)
SG	0,015	>0,015	-
NO ₂	0,136	>0,136	-
Zn-Al LDH SG	0,015	>0,015	-
Zn-Al LDH NO ₂	0,0136	>0,0136	1,555 (1.314 – 1.840)
Zn-Al LDH	0,041	0,015	4,047 (2.397 – 6.833)

3.2 Resultados Definitivos

As concentrações foram determinadas a partir dos resultados dos testes preliminares apresentados acima. Os valores foram apresentados na Tabela 3. Os gráficos de comparação com o controle estão na Figura 7. Os resultados obtidos no teste com substância de referência indicaram CE₅₀ de 1,87 (1.628 – 2.150) mg/L (Anexo II). Estes valores estiveram próximos daqueles observados por Soares & Resgalla Júnior (2016), numa análise da sensibilidade de equinodermos a diferentes substâncias de referência; para DSS os autores encontraram uma CE₅₀ de 1,41 mg/L para *E. lucunter*.

No que se refere ao nanomaterial vazio, Zn-Al LDH apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) a partir da concentração de 3,70 mg/L (CEO), exibindo uma CE₅₀ de 6,242 mg/L. Nas concentrações de 33,3 e 100 mg/L houve 100% de desenvolvimento anormal.

Quanto aos inibidores de corrosão em sua forma livre, para SG a diferença significativa em relação ao controle ocorre a partir da segunda menor concentração 0,41 mg/L e CE₅₀ é 1,209 mg/L. Já para NO₂, a diferença significativa em relação ao controle ocorre a partir da concentração de 1,23 mg/L e nenhuma concentração atingiu a mortalidade de, ao menos, 50% dos organismos. Dentre os compostos testados NO₂ livre apresentou menor toxicidade para embriões de *E. lucunter*.

Os compostos associados aos nanomateriais: Zn-Al LDH NO₂ e Zn-Al LDH SG, apresentaram os menores valores de CE₅₀, 0,41 mg/L e 0,67 mg/L indicando maior toxicidade, dentre os compostos testados, para os embriões de *E. lucunter*, respectivamente. Em Zn-Al LDH NO₂, todas as concentradas testadas apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, enquanto Zn-Al LDH SG apresentou

diferença a partir de 0,41 mg/L. Os dois compostos apresentaram um CEO de 0,41 mg/L.

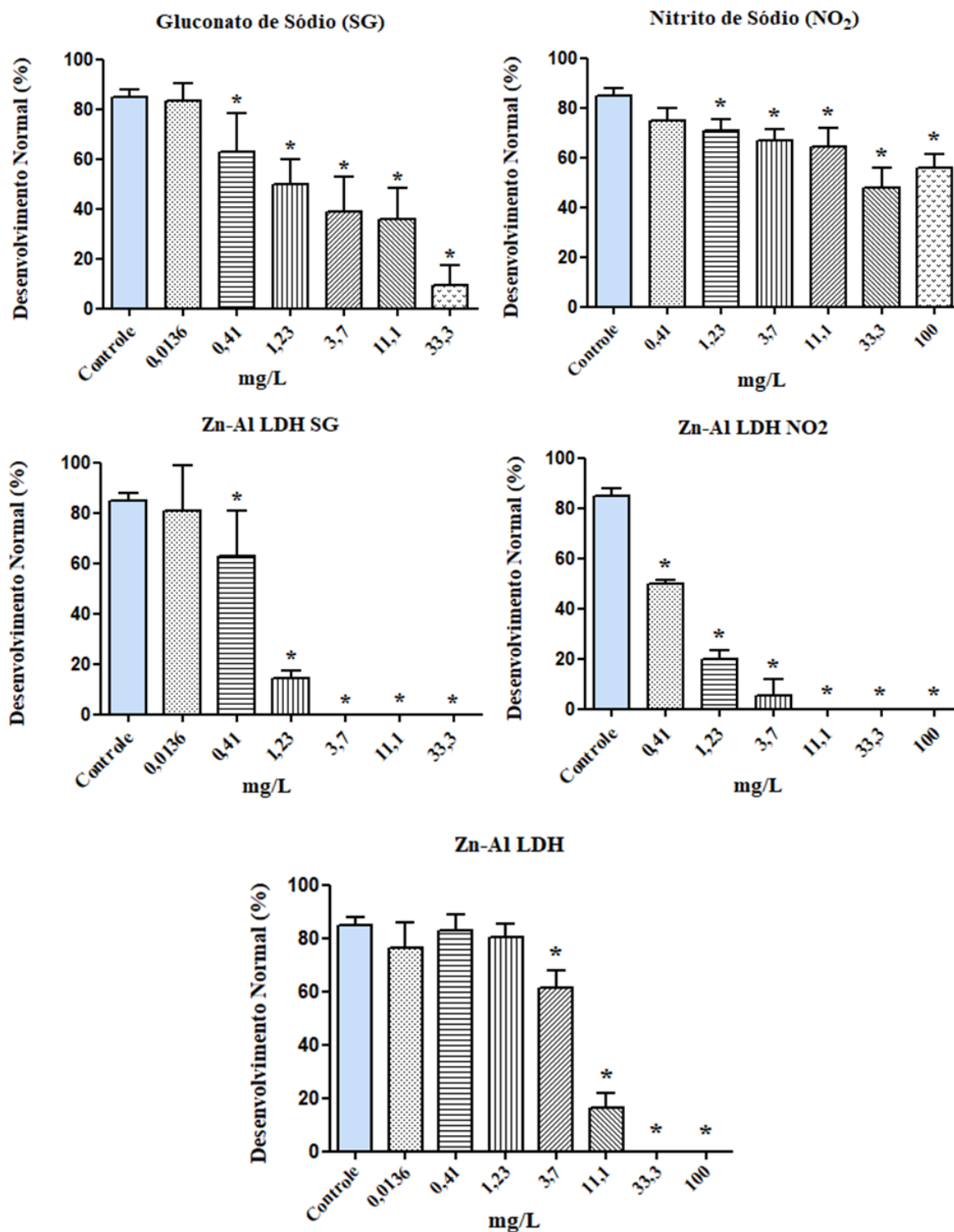


Figura 7. Desenvolvimento embriolar do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares, Zn- Al LDH, SG e NO₂ livre e imobilizado Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH NO₂. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 3. Resultados dos testes ecotoxicológicos de desenvolvimento embriolar de *Echinometra lucunter*, em mg/L, indicando os fatores: Concentração de Efeito Observado

(CEO); Concentração de Efeito Não Observado (CENO); e Concentração Efetiva para 50% dos organismos (CE₅₀) e seus intervalos de confiança (IC);

Composto	CEO	CENO	CE ₅₀ (± IC - 95%)
SG	0,41	0,0136	1,209 (0.5666 – 0.2882)
NO ₂	1,23	0,41	-
Zn-Al LDH SG	0,41	0,0136	0,6746 (0.5069 – 0.8978)
Zn-Al LDH NO ₂	> 0,41	0,41	0,4119 (0.3772 – 0.4496)
Zn-Al LDH	3,7	1,23	6,242 (5.312 – 7.335)

4. Discussão

No presente estudo, a taxa de desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* indicou os seguintes níveis de toxicidade para os compostos testados (segundo teste definitivo), considerando as CE₅₀: Zn-Al LDH NO₂ > Zn-Al LDH SG > SG > Zn-Al LDH > NO₂. Os experimentos exibiram maior toxicidade para os compostos nanoencapsulados, quando comparados com os respectivos compostos livres, refutando a segunda hipótese deste trabalho. No entanto, deve-se observar que as CEO do SG e do Zn-Al LDH SG foram similares (0,41 mg/L), diferente do NO₂, cuja CEO (1,23 mg/L) foi muito maior do que a CEO do composto nanoestruturado (> 0,41 mg/L). Assim, os compostos livres apresentaram menor toxicidade, principalmente o NO₂, que foi menos tóxico do que o SG, o que corrobora com a primeira hipótese deste trabalho.

Em relação a embriotoxicidade dos compostos nanoencapsulados Zn-Al LDH NO₂ e Zn-Al LDH SG, esta pode estar diretamente relacionada ao íon metálico Zn⁺. Fairbair *et al.* (2011) compararam a toxicidade do óxido de zinco (ZnO) com dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de cério (CeO₂), em suas formas livres e nanoestruturadas, nas larvas plúteos do ouriço-do-mar *Lytechinus pictus* e observaram que os compostos com ZnO apresentaram maior toxicidade, demonstrando resultados já na faixa dos µm/L. Em compostos anti-incrustantes, segundo Hoch *et al.* (2019) também foi encontrado maior toxicidade crônica em ZnPT e ZnPT NM para as larvas plúteos do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Outros estudos toxicológicos indicaram que íons metálicos livres são amplamente reconhecidos por permearem as membranas biológicas e sugerem que o mecanismo de toxicidade de nanopartículas de prata resultou do íon Ag (Ag⁺) (Navaro, 2008; Bar-Ilan, 2009; Xiu *et al.*, 2011).

Além do íon Zn⁺, uma alternativa que pode estar associada a toxicidade dos compostos nanoencapsulados é a solubilidade das soluções. As características físico-químicas do meio influenciam na dissolução dos íons e na agregação dos nanomateriais, o que consequentemente afeta a biodisponibilidade e a toxicidade (Handy *et al.*, 2018).

Isso ocorre pois o aumento da força iônica (concentração de íons) aumenta a agregação e pode reduzir a solubilidade (Keller *et al.*, 2010).

Análises com outro inibidor de corrosão foram realizadas por nosso grupo de pesquisa de modo similar ao presente estudo (dados não publicados), no qual foi averiguada a ecotoxicidade do 2- mercaptobenzoatiol (MBT) e das nanocápsulas Zn-Al LDH e Mg-Al LDH em embriões ouriço-do-mar *E. lucunter* e o copépodo *Nitrokra sp.* O MBT composto aromático heterocíclico que contém nitrogênio e enxofre em sua formulação, facilitando a formação de complexos hidrofóbicos que atuam como uma barreira contra o ambiente corrosivo (Rani & Basu, 2012). Os resultados indicaram que para os dois organismos o nanomaterial descarregado Zn-Al LDH apresentou maior toxicidade quando comparado ao Mg-Al LDH, indicando que as nanoargilas contendo Mg e Al possuem um melhor desempenho ambiental pela menor toxicidade. No entanto, em embriões de *E.lucunter*, o MBT nanoencapsulado em suas duas formas reduziu a toxicidade do MBT livre, diferente do que foi encontrado neste trabalho. Martins *et al.* (2016), avaliaram a toxicidade do MBT livre, MBT nanoencapsulado com LDH e LDH descarregado para o molusco *Ruditapes philippinarum*, e reportaram que este possui potencial para ser absorvido e assimilado pelo sistema digestivos dos organismos, pois quando liberado no meio, reage e forma complexos químicos, comportamento similar a outros nanomateriais.

Os hidróxidos duplos lamelares (LDHs) apresentam sua própria toxicidade e podem apresentar potenciais efeitos negativos no ambiente aquático, mas poucas informações estão disponíveis sobre sua toxicidade para os organismos. De acordo com Ding *et al.* (2018), o nanomaterial descarregado LDH apresentou CE₅₀ de 10 mg/L para o crescimento da alga *S. quadricauda*. Para Hoch *et al.* (2019), os resultados do LDH descarregado foram que não houve toxicidade aguda aos náuplios de *Artemia salina* e nem toxicidade crônica de curto prazo para estágios iniciais no desenvolvimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*, no entanto, para desenvolvimento embrionário de *P. lividus* uma CE₅₀ de 2 mg/L. Em comparação, nosso estudo apresentou uma toxicidade intermediária para Zn-AL LDH com um CE₅₀ de 6,2 mg/L, o que indica que a toxicidade pode variar de acordo com a sensibilidade e o estágio de desenvolvimento do organismo.

A funcionalidade do gluconato de sódio como um efetivo inibidor de corrosão foi confirmada por diversos estudos (Touir *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Ou & Hsieh, 2016), assim como o uso do nitrito de sódio (Karim *et al.*, 2010; Lee *et al.*,

2012; Ye *et al.*, 2021; Rizvi *et al.*, 2021). No entanto, a escassez de pesquisas acerca da ecotoxicidade desses compostos em organismos aquáticos demonstra a importância desta pesquisa e manifesta a necessidade de novos estudos, antes da disponibilização destes compostos no mercado e no meio, já que não compreendemos em sua totalidade os efeitos que serão gerados ao ecossistema.

5. Conclusão

Os resultados obtidos sobre o desenvolvimento de embriões de ouriço-do-mar *E. lucunter* indicaram o potencial tóxico das substâncias avaliadas, indicando maior toxicidade para os compostos nanoencapsulados e sugerindo que a imobilização em hidróxidos duplos lamelares aumentou os efeitos tóxicos potenciais para este organismo. Os efeitos observados podem estar associados à presença do íon metálico Zn^{+} , que apresentou potencial de toxicidade, que afeta diretamente a biodisponibilidade e a toxicidade dos nanomateriais.

6. Referências Bibliográficas

- Abessa, D.M.S. (2016). Avaliação de risco ecológico no Rio Ribeira de Iguape (SP, Brasil) devido à contaminação por antigas atividades de mineração. Tese de Livre Docência, UNESP. São Vicente, SP
- Abel, P. D. (1989). Water pollution biology. *Chichester: Ellis Horwood Limited*.
- 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 NBR - Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2012). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata; Echinoidea).
- Adams, S.M, Greeley, M.S. (2000). Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Assess the Health of Aquatic Ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 123, p. 103-115.
- 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*, v. 19(2), p. 164-174.
- Barros, J.P.N.L., Salgueiro, F.R., Cid, N.G.A., Cid, R.S. (2019). Atividade de campo: coleta de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*) e ensaios ecotoxicológicos. *Unisanta BioScience*, v. 8(4), p. 343-348.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E., & Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), 1897-1910.
- Bellas, J. (2008). Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay. *Aquat. Toxicol.*, v. 88(4), p. 308–315
- 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*, v. 154, p. 106719.
- Bonfim, C.L.L. (2005). Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embrionar de *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. *Universidade Federal da Bahia*.
- Cai, Y., Xu, Y., Zhao, Y., Zhou, K., Ma, X. (2020). A spatial-temporal approach for corrosion prediction in time-varying marine environment. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, v. 66, p. 104161.
- Carr, G.J., Belanger, S.E. (2019). SSDs revisited: Part I—A framework for sample size guidance on species sensitivity distribution analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 38(7), p. 1514-1525.

- 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.
- Cruz, A.C. (2001). Seleção de substâncias orgânicas como referência em testes de toxicidade com embriões de ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928): Controle da qualidade analítica de testes ecotoxicológicos. *Universidade Federal da Bahia*.
- Ding, T., Lin, K., Chen, J., Hu, Q., Yang, B., Li, J., & Gan, J. (2018). Causes and mechanisms on the toxicity of layered double hydroxide (LDH) to green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Science of the Total Environment*, 635, 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.222>
- Dinnel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letouneau, M.W., Roberts, W.E. (1989). Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 755, p. 748-755.
- Environment Canada. (1992). Biological test method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). Environment Canada, Environmental Protection, Conservation and Protection. Environmental Protection Series Report EPS 1/ RM/27, Ottawa, Canada.
- Fairbairn, E.A., Keller, A.A., Mädler, L., Zhou, D., Pokhrel, S., Cherr, G.N. (2011). Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development. *Journal of Hazardous Materials*, v. 192(3), p. 1565–1571.
- Figueiredo J., *et al.* (2019). Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. *Environmental Science: Nano*, v. 50, p. 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.
- Ha, V. (1996) Manual of biocorrosion. *CRC Press*, London.
- Hamadi L., *et al.* (2018). The use of amino acids as corrosion inhibitors for metals: A review. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 27(4), p. 1157–1165.
- Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, v. 17, p. 315-32.

- Hang, T.T.X. *et al.* (2012). Preparation and characterization of nanocontainers of corrosion inhibitor based on layered double hydroxides. *Applied Clay Science*, v. 67–68, p. 18–25.
- 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.
- Hendler, G., Miller, J. E., Pawson, D. L., Kier, P. M. (2009). Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean.
- Hoch, E.G., 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*, v. 251, p. 530-537.
- ISO, International Organization for Standardization 8044. (1986). Corrosion of metals and alloys – Terms and definitions.
- Javaherdashti, R. (2000). Microbiologically influenced Corrosion. *Anti-Corrosion Methods Mater*, v. 47, p. 30-34.
- Karim, S., Mustafa, C. M., Assaduzzaman, M., & Islam, M. (2010). Effect of nitrate ion on corrosion inhibition of mild steel in simulated cooling water. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 14(2), 87-91.
- Keller, A.A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H.S., Cherr, G., Cardinale, B.J., Miller, R., Ji, Z. (2010). Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.*, v. 44, p. 1962-1967
- Koch, G., Varney, J., Thompson, N., Moghissi, O., Gould, M., Payer, J. (2016). International measures of prevention, application, and economics of corrosion technologies study. *NACE international*, v. 216, p. 2-3.
- Lawrance, J. M. (1975). On the relationship between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology*. v. 13, p. 213-286.
- Lee, D. Y., Kim, W. C., & Kim, J. G. (2012). Effect of nitrite concentration on the corrosion behaviour of carbon steel pipelines in synthetic tap water. *Corrosion Science*, 64, 105-114.
- 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. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 10, p. 956-968.
- 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), 1287–1298.
- 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*, v. 4(5), p. 1064-1076.
- Mastroti, R.R. (2002). Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (fertilização)., in: NASCIMENTO, I.A., SOUSA, E.C.P.M., NIPPER, M. (Eds.), todos. Em *Ecotoxicologia: Aplicações no Brasil*. Artes Gráficas e Indústria LTDA. São Paulo, p. 262.
- Mattson, E. (1989). Basic corrosion technology for scientists and engineers. *Ellis Horwood Publishers*, West Sussex, England.
- Mazumder, M.A.J. (2020). Global impact of corrosion: Occurrence, cost and mitigation. *Global Journal of Engineering Sciences*, v. 5(4), p. 0-4.
- 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.
- Mello, L.C., Fonseca, T.G., Abessa, D.M.S. (2020). Using toxicity tests with embryos of *Mellita quinquiesperforata* in the ecotoxicological assessment of chemotherapeutic agents. *Marine Pollution Bulletin*. v. 159.
- Montemor, M.D.F. (2014). Functional and smart coatings for corrosion protection: A review of recent advances. *Surface and Coatings Technology*, v. 258, p. 17-37.
- 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.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., ... & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386.
- 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*, v. 302, p. 160-167.
- Perina, F.C., Abessa, D.M.S., Pinho, G.L.L., Fillmann, G. (2011). Comparative toxicity of antifouling compounds on the development of sea urchin. *Ecotoxicology*, v. 20(8), p. 1870-1880.
- Prósperi, V.A., Araújo, M.M.S. (2002). Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. (Eds.). *Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 99-110.

- 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.
- Resende, C., da Silva, V. H. M., Martelli, P. B., Bueno, A. H. S. (2018). Efeito do nitrito de sódio como inibidor de corrosão em concreto armado na presença de CO₂ e cloreto. *Rev. Virtual Quim.*, v. 10(5), p. 1546-1561.
- Resgalla Jr, C., Laitano, K. S. (2002). Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 6(1), p. 153-163.
- Rizvi, M., Gerengi, H., Kaya, S., Uygur, I., Yıldız, M., Sarioglu, I., ... & El Ibrahim, B. (2021). Sodium nitrite as a corrosion inhibitor of copper in simulated cooling water. *Scientific Reports*, 11(1), 1-16.
- Roberge, P. R. (2008). Handbook of Corrosion Engineering. [s.l: s.n.].
- 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>
- Sastri, V.S. (2011). Green corrosion inhibitors: theory and practice. 1. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 328 p.
- Shchukin, D.G. *et al.* (2008) Active Anticorrosion Coatings with Halloysite Nanocontainers. *Journal of Physical Chemistry*, p. 958–964.
- Smith, M. M., Cruz Smith, L., Cameron, R. A., & Urry, L. A. (2008). The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Morphology*, 269(6), 713-733.
- Soares, J. B., Resgalla Junior, C. (2016). Echinodermata in ecotoxicological tests: maintenance and sensitivity. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 64, p. 29-36.
- Tayemeh, M. B., et al., 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 Appl. Mater. Interfaces*, v. 2, p. 1528-1535.
- Tornero, V., Hanke, G. (2016). Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources: a review with a focus on European seas. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 112, p. 17-38.
- Touir, R., Dkhireche, N., Touhami, M. E., El Bakri, M., Rochdi, A. H., & Belakhmima, R. A. (2014). Study of the mechanism action of sodium gluconate used for the protection of scale and corrosion in cooling water system. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 873-881.

- Tyas, M.J. (1978). In vitro toxicity tests of zinc phosphate cement. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 5(4), p. 339-347.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2002). Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA-821-R-02-013. Washington: USEPA. 317 p.
- Xiu, Z. M., Ma, J., & Alvarez, P. J. (2011). Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environmental science & technology*, 45(20), 9003-9008.
- Ye, H. (2022). Self-assembly of corrosion inhibitors-intercalated layered double hydroxides (LDHs) in cementitious systems. *Applied Clay Science*, 216, 106380.
- Zagatto, P.A & Bertoletti, E. (2006). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima, São Carlos.
- Zhang, L., Lei, C., Chen, J., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D. (2015). Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae. *Carbon*, 83, 198-207.
- Zheludkevich, M. L., Poznyak, S. K., Rodrigues, L. M., Raps, D., Hack, T., Dick, L. F., Nunes, T. & Ferreira, M. G. S. (2010). Active protection coatings with layered double hydroxide nanocontainers of corrosion inhibitor. *Corrosion Science*, 52(2), 602–611.

Anexo I

Valores dos parâmetros físico-químicos

Experimento 3 - Inicial				Experimento 3 - Final			
Composto	pH	O2	Sal	Composto	pH	O2	Sal
Controle	8,21	5,85	35	Controle	8,3	5,56	35
SG C1	8,19	5,91	35	SG C1	8,3	5,66	35
SG C2	8,31	6,66	34	SG C2	8,34	5,74	35
SG C3	8,3	6	35	SG C3	8,2	5,62	35
SG C4	8,22	5,88	35	SG C4	8,19	5,57	35
SG C5	8,28	6,15	35	SG C5	8,34	5,7	36
SG C6	8,11	5,99	35	SG C6	8,4	5,57	37
Zn-Al LDH SG C1	8,12	6,04	35	Zn-Al LDH SG C1	8,18	5,86	35
Zn-Al LDH SG C2	8,14	5,91	35	Zn-Al LDH SG C2	8,24	5,53	35
Zn-Al LDH SG C3	8,19	5,93	35	Zn-Al LDH SG C3	8,23	5,66	35
Zn-Al LDH SG C4	8,6	5,92	36	Zn-Al LDH SG C4	8,42	5,53	35
Zn-Al LDH SG C5	8,48	5,97	36	Zn-Al LDH SG C5	8,19	5,62	36
Zn-Al LDH SG C6	8,21	5,95	36	Zn-Al LDH SG C6	8,25	5,55	37
Zn-Al LDH C1	8,37	5,79	35	Zn-Al LDH C1	8,17	5,03	35
Zn-Al LDH C2	8,42	5,89	35	Zn-Al LDH C2	8,29	5,37	35
Zn-Al LDH C3	8,16	5,93	35	Zn-Al LDH C3	8,22	5,39	35
Zn-Al LDH C4	8,13	5,89	35	Zn-Al LDH C4	8,17	5,43	35
Zn-Al LDH C5	8,12	6,19	36	Zn-Al LDH C5	8,32	5,41	36
Zn-Al LDH C6	8,12	6,09	36	Zn-Al LDH C6	8,15	5,47	36
Zn-Al LDH C7	8,1	6,02	35	Zn-Al LDH C7	8,28	5,47	36
NO2 C1	8,49	6,16	35	NO2 C1	8,44	5,63	35
NO2 C2	8,14	6,11	35	NO2 C2	8,21	5,57	35
NO2 C3	8,17	6,02	35	NO2 C3	8,24	5,49	35
NO2 C4	8,12	6,15	35	NO2 C4	8,11	5,42	35
NO2 C5	8	5,96	35	NO2 C5	7,82	5,42	35
NO2 C6	8,24	5,96	35	NO2 C6	8,27	5,48	36
Zn-Al LDH NO2 C1	8,08	5,55	35	Zn-Al LDH NO2 C1	8,25	5,35	35
Zn-Al LDH NO2 C2	8,11	5,93	35	Zn-Al LDH NO2 C2	8,08	5,52	35
Zn-Al LDH NO2 C3	8,11	6,15	35	Zn-Al LDH NO2 C3	7,92	5,38	35
Zn-Al LDH NO2 C4	8,12	6	36	Zn-Al LDH NO2 C4	8,2	5,49	36
Zn-Al LDH NO2 C5	8,21	5,91	36	Zn-Al LDH NO2 C5	8,35	5,34	36
Zn-Al LDH NO2 C6	8,15	5,95	35	Zn-Al LDH NO2 C6	8,07	5,39	35
DSS C1	8,2	5,97	35	DSS C1	8,25	5,56	36
DSS C2	8,09	5,88	35	DSS C2	7,98	5,57	35
DSS C3	8,04	5,96	35	DSS C3	7,31	5,4	36
DSS C4	8,2	5,91	35	DSS C4	7,82	5,39	36
DSS C5	8,08	5,8	35	DSS C5	8,16	5,57	36

Anexo II

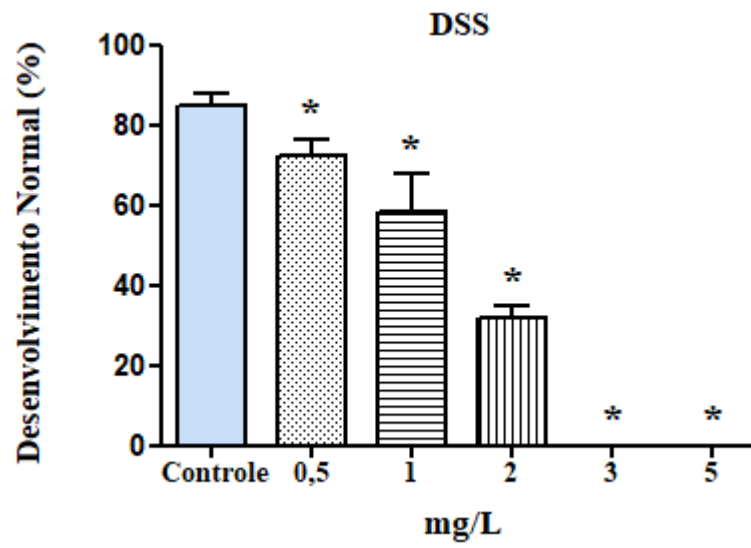


Figura 8. Desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares, Zn- Al LDH, SG e NO₂ livre e imobilizado Zn-Al LDH SG e Zn-Al LDH NO₂. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**Discente:** ISABELLA BEVERARI COUTO**Título:** "Avaliação ecotoxicológica dos inibidores de corrosão biológicos: Gluconato de Sódio (SG) e Nitrito de Sódio (SN), em suas formas livres e nanoencapsuladas, sobre embriões de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*)"**Orientador:** Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa**Curso/Habilitação:** Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa	APROVADA
Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso Choueri	APROVADA

PARECER:

CONCEITO FINAL:A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Isabella Beverari Couto** obteve o seguinte conceito:

APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 27 de janeiro de 2023.


Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa
Profa. Dra. Paloma Kachel Gusso Choueri