

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA**

Douglas Gomes Gonçalves

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE INIBIDORES DE CORROSÃO MARINHA DE
BASE NANOTECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL SOBRE *Chlorella minutissima***

São Vicente
2023

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE INIBIDORES DE CORROSÃO MARINHA DE
BASE NANOTECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL SOBRE *Chlorella minutissima***

Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista. Para obtenção do título de grau de Bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha.

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Co-orientadora: Caterina do Valle Trotta

G635a

Gonçalves, Douglas Gomes

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE INIBIDORES DE CORROSÃO MARINHA
DE BASE NANOTECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL SOBRE *Chlorella minutissima* /
Douglas Gomes Gonçalves. -- São Vicente, 2023

47 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

Coorientadora: Caterina do Valle Trotta

1. Bioquímica. 2. Biologia molecular. 3. Nanocompósitos (Materiais). I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família em especial meus pais, Gerolina e Silvio, que me apoiaram neste sonho desde o início, e me deram todo o suporte necessário para minha graduação. Incluo também meus irmãos, Thielles e Thiago, seus cônjuges, Luís e Alessandra e aos sobrinhos Stefany, Yago e Lucca.

Agradeço muito a minha orientadora, a Prof^a Dr^a. Cristiane Angélica Ottoni, a toda preocupação, auxílio, paciência e dedicação durante todo este processo.

Agradeço à minha Co-orientadora, Caterina do Valle Trotta, por estar ao meu lado nos experimentos e auxílio.

Agradeço ao Dr. Caio Cesar Ribeiro, do laboratório NEPEA, pelo auxílio no texto e principalmente na análise de dados.

Agradeço aos meus amigos, Bruna, Homer, Maria e Thainá, eu amo vocês e sinto falta todos os dias de estar sempre juntos.

Agradeço a turma XVII, que com vocês pude viver e crescer durante todos estes anos e tornaram minha graduação muito mais leve e feliz. Em especial Copas, Restolho, Biroujuice, Gugu, Abancada, Trem, Malagueta e Muuuuvies. com quem fui muito próximo.

Agradeço a República REPilica, com quem vivi meus dois últimos anos de graduação. Amazonas, Baseácido, Canelinha, Gorote e Agro. O lugar de vocês é mais que especial dentro de mim pro resto da vida. Incluo também nossos "filhos", K-lote, Formol, Scindy e 7belo.

Agradeço a AAACLP por fazer parte da minha jornada durante 5 anos e me proporcionou experiências incríveis que nunca poderia ter imaginado.

Agradeço ao Instituto de Estudo Avançados do Mar (IEAMar) onde fiz parte do experimento e um estágio por um ano.

Agradeço ao PIBIC e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A corrosão (CO) marinha promove sérias perdas econômicas, ameaça à segurança humana e ao equilíbrio ecológico do ambiente marinho. Dentre os diversos processos de CO relacionados às questões estruturais, 20% estão associados à atividade microbiana. A corrosão influenciada por microrganismos (CIM) desencadeia a perda econômica de bilhões de dólares ao ano. Os inibidores de corrosão (IC), tais como os biocidas 2-mercaptobenzotiazol (MBT) e Gluconato de Sódio (SG), são frequentemente incorporados a revestimentos contra CIM. O hidróxido duplo lamelar (LDH), na forma nanoestruturada (NE), armazena os IC, reduzindo a liberação espontânea e promovendo de forma controlada a liberação dos compostos supracitados. Diante deste contexto, foi avaliada a toxicidade de NE de LDH associados aos IC MBT e SG contra a microalga marinha *Chlorella minutissima*. Os ensaios foram conduzidos em placas de 96 poços expondo *C. minutissima* ($1,0 \times 10^5$ cel/mL, fase exponencial) a 7 compostos (Zn-Al LDH-SG, Zn-Al LDH-MBT, Mg-Al LDH-MBT, Zn-Al LDH, Mg-Al LDH, MBT, SG) em concentrações compreendidas entre 0,05-100 mg/L por 72h. A inibição no crescimento celular de *C. minutissima* foi acompanhada por densidade óptica (DO), a 670 nm. Foram determinadas concentração de inibição a 50% dos organismos (IC_{50}), Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO). Dentre os 7 compostos analisados, o MBT apresentou a maior toxicidade IC_{50} 24h - 2,06 mg/L, IC_{50} 48h - 1,31 mg/L e IC_{50} 72h - 1,35 mg/L, contudo, nas versões NE o valor de IC_{50} , sendo Zn-Al LDH-MBT IC_{50} 24h - 4,75 mg/L, IC_{50} 48h - 8,90 mg/L e IC_{50} 72h - 11,97 mg/L e Mg-Al LDH-MBT IC_{50} 24h - 18,03 mg/L, IC_{50} 48h - 2,11 mg/L e IC_{50} 72h - 0,18 mg/L foi maior, portanto menos tóxico. Com relação ao biocida SG, nas concentrações testadas, não foi possível calcular seu IC_{50} , entretanto, SG apresentou um valor de CEO de 0,05 mg/L em todos os tempos de exposição. Em acréscimo, NE Zn-Al LDH-SG apresentou um aumento significativo na densidade celular na concentração de 100 mg/L no tempo de 72h. Resultando em um CEO de 100 mg/L e um CENO de 33,3 mg/L. Diante dos resultados obtidos, os compostos NE em LDH se apresentam como uma alternativa eficiente contra a CIM e, conseqüentemente, contra a CO, entretanto, é menos agressiva ao ambiente marinho. Contudo, são necessários estudos com outras espécies de algas e outros níveis tróficos.

Palavras-chave: Inibidores de corrosão, Hidróxido duplo lamelar, 2-mercaptobenzotiazol, gluconato de sódio, *Chlorella minutissima*.

ABSTRACT

Marine corrosion (CO) promotes serious economic losses, threatens human safety and the ecological balance of the marine environment. Among the various CO processes related to structural issues, 20% are associated with microbial activity. Microorganism-influenced corrosion (MIC) causes economic loss of billions of dollars a year. Corrosion inhibitors (CI) such as the biocides 2-mercaptobenzothiazole (MBT) and Sodium Gluconate (SG) are often incorporated into coatings against MIC. The Layered Double Hydroxides (LDH), in the nanostructured form (NE), stores the IC, reducing the spontaneous release and promoting the release of the aforementioned compounds in a controlled manner. Given this context, the toxicity of NE of LDH associated with IC MBT and SG against the marine microalgae *Chlorella minutissima* was evaluated. Assays were conducted in 96-well plates exposing *C. minutissima* (1.0×10^5 cel/mL, exponential phase) to 7 compounds (Zn-Al LDH-SG, Zn-Al LDH-MBT, Mg-Al LDH-MBT, Zn-Al LDH, Mg-Al LDH, MBT, SG) in concentrations between 0.05-100 mg/L for 72h. Inhibition of *C. minutissima* cell growth was monitored by optical density (OD) at 670 nm. 50% inhibition concentration of organisms (IC_{50}), No Observed Effect Concentration (CENO) and Observed Effect Concentration (OEC) were determined. Among the 7 compounds analyzed, MBT showed the highest toxicity IC_{50} 24h - 2.06 mg/L, IC_{50} 48h - 1.31 mg/L and IC_{50} 72h - 1.35 mg/L, however, in the NE versions the value of IC_{50} , being Zn-Al LDH-MBT IC_{50} 24h - 4.75 mg/L, IC_{50} 48h - 8.90 mg/L and IC_{50} 72h - 11.97 mg/L and Mg-Al LDH-MBT IC_{50} 24h - 18.03 mg/L, IC_{50} 48h - 2.11 mg/L was higher, therefore less toxic. With regard to the biocide SG, at the tested concentrations, it was not possible to calculate its IC_{50} , however, SG presented a CEO value of 0.05 mg/L at all exposure times. In addition, NME Zn-Al LDH-SG showed a significant increase in cell density at a concentration of 100 mg/L at 72h. Resulting in a CEO of 100 mg/L and a CENO of 33.3 mg/L. In view of the results obtained, the NE compounds in LDH are presented as an efficient alternative against MIC and, consequently, against CO, however, it is less aggressive to the marine environment. However, studies with other species of algae and other trophic levels are needed.

Keywords: Corrosion inhibitors, Layered Double Hydroxides, 2-mercaptobenzothiazole, sodium gluconate, *Chlorella minutissima*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BT - Benzotiazóis

CE₅₀ - Concentração de Efeito a 50%

CEO - Concentração de Efeito Observado

CENO - Concentração de Efeito Não Observado

CIM - Corrosão Influenciada por Microorganismos

CO - Corrosão

CuPT - Piritionato de cobre

DCOIT - 4,5-Dicloro-2-n-octil-4-isotiazolin-3-ona

IC - Inibidores de Corrosão

IC₅₀ - Concentração de Inibição a 50% das Células

LDH - Hidróxido Duplo Lamelar

MBT - 2-mercaptobenzotiazol

Mg-Al LDH - Mg-Al Nanoestruturado

Mg-Al LDH-MBT - Mg Al mercaptobenzotiazol Nanoestruturado

NME - Nanomateriais Engenheirados

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

SG - Gluconato de Sódio

Zn-Al LDH - Zn-Al Nanoestruturado

Zn-Al LDH-MBT - Zn-Al Mercaptobenzotiazol Nanoestruturado

Zn-Al LDH-SG - Zn-Al-gluconato de sódio nanoestruturado

ZnPT - Piritionato de Zinco

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Revisão Bibliográfica.....	9
2.1. Corrosão influenciada por microrganismos (CIM).....	9
2.2. Utilização de microalgas marinhas como biomarcadores.....	10
2.3. Biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT).....	11
2.4. Biocida Gluconato de Sódio (SG).....	12
2.5. Hidróxido duplo lamelar (LDH).....	12
3. Objetivos.....	13
4. Materiais e Métodos.....	13
4.1. Inibidores de Corrosão.....	13
4. 2. Cultura de microalgas.....	13
4. 3. Ensaio de ecotoxicidade de microalgas em placas de 96 poços.....	14
4. 6. Análise de Dados.....	15
5. Resultados.....	15
5.1. Toxicidade.....	15
5.1.1. Toxicidade do MBT.....	15
5.1.2. Toxicidade do SG.....	18
5.1.3. Toxicidade do Zn-Al LDH.....	21
5.1.4. Toxicidade do Mg-Al LDH.....	24
5.1.5. Toxicidade do Zn-Al LDH-MBT.....	27
5.1.6. Toxicidade do Mg-Al LDH-MBT.....	30
5.1.7. Toxicidade do Zn-Al LDH SG.....	33
5.2. CENO e CEO.....	36
5.3. IC ₅₀	37
6. Discussão.....	39
7. Conclusão.....	40
8. Referências.....	40

1. Introdução

A corrosão (CO) marinha não só promove sérias perdas econômicas, mas também, ameaça à segurança pessoal e o equilíbrio ecológico do ambiente marinho. Dentre os diversos processos de CO relacionados às questões estruturais ou falhas de materiais, 20% estão associados à atividade microbiana [1]. Segundo Procópio [2] durante o processo de formação do biofilme, existe a participação de diferentes espécies microbianas, que criam um ambiente favorável para que ocorra a CO. Somente nos Estados Unidos da América, as perdas anuais atribuídas a CO influenciada por microrganismos (CIM) foram estimadas em US\$100 milhões [3].

A CIM está associada a bactérias, Archaea, fungos, líquens e algas [4]. A participação das microalgas no processo de CO não é bem clara, contudo, é descrita como constituinte da etapa de formação do biofilme microbiano [5,6]. As microalgas marinhas são consideradas o principal suporte trófico em diversos ecossistemas aquáticos, deste modo, é fundamental avaliar o efeito de compostos que possam afetar a sua população e, consequentemente, impactar níveis tróficos mais elevados [7]. O gênero *Chlorella*, microalga verde eucariótica, é principalmente referenciado devido ao seu amplo campo de aplicação, incluindo o setor farmacêutico e alimentar [8], além disso, são também mencionadas como excelentes bioindicadores naturais [9].

Agentes químicos utilizados geralmente para a proteção de estruturas metálicas contra bioincrustação e biocorrosão, apresentam normalmente elevada toxicidade e, consequentemente, podem promover impactos negativos no ambiente aquático. Um dos principais métodos adotados pela indústria para prevenir ou minimizar a CO é o uso de inibidores de CO (IC) específicos. Tais IC são substâncias orgânicas ou inorgânicas, que ao serem adicionadas ao meio corrosivo, evitam ou diminuem o desenvolvimento das reações de CO. Esses IC normalmente são adsorvidos, formando um filme muito fino e persistente. Este filme proporciona a diminuição na taxa de CO, devido ao abrandamento de reações anódicas (inibidores anódicos), reações catódicas (inibidores catódicos) ou ambas (inibidores mistos) [10]. Os aditivos anticorrosivos possuem duas funções específicas, prevenir o contato entre agente corrosivo e as partes metálicas e remoção dos agentes de CO presentes através da neutralização das substâncias ácidas [11]. Os IC 2-mercaptobenzotiazol (MBT) e gluconato de sódio (SG) são amplamente utilizados em revestimentos protetores anticorrosivos, entretanto, são liberados nos estágios iniciais de vida desses revestimentos. Para superar esta

demanda, os IC podem ser imobilizados em nanomateriais engenheirados (NME), como o hidróxido duplo lamelar (LDH). Diante do exposto, sete compostos IC foram avaliados quanto às suas respectivas toxicidades quando expostos à microalga marinha *Chlorella minutissima*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Corrosão influenciada por microrganismos (CIM)

O oceano representa cerca de 71% da área total da Terra e é extremamente rico em recursos. O desenvolvimento e a utilização do oceano são essenciais para a sociedade [12]. As superfícies submersas em água marinha são rapidamente colonizadas por microrganismos. Os microrganismos associados a estas superfícies desempenham papéis importantes em diversos processos marinhos, incluindo remineralização de matéria orgânica, regeneração de nutrientes e ciclagem de elementos, concentração e transferência de contaminantes (como metais pesados). Em teias alimentares, promovem a indução de assentamento larval de invertebrados bentônicos e biodegradação de compostos xenobióticos [13]. Entretanto, materiais como o aço inoxidável, um dos materiais mais amplamente utilizados na indústria naval, sofrem o processo de corrosão (CO) severa, principalmente em decorrência da presença de diversos microrganismos corrosivos. A corrosão influenciada por microrganismos (CIM) desencadeia a perda econômica de bilhões de dólares ao ano [12].

O termo CIM ou biocorrosão, foi reportado pela primeira vez na literatura por Richard H. Gaines no ano de 1910, quando associou o processo de corrosão a atividades bacterianas. Em linhas gerais, a CIM abrange dois cenários, sendo o primeiro descrito pela ação de direta dos microrganismos que causam a corrosão, os microrganismos secretam metabólitos corrosivos ou coletam elétrons de um metal para a respiração produzindo energia e, no segundo cenário, os microrganismos atuam em focos de corrosão preexistentes, causados por um agente corrosivo, como água e CO₂, comprometendo o filme passivo (geralmente um filme de óxido metálico sobre um metal) [14].

No ambiente marinho, a grande maioria dos microrganismos que possuem a capacidade de iniciar a CO em metais são as bactérias, Archaea e fungos [15], entretanto, Mieszkina et al. [16] demonstrou experimentalmente que os biofilmes bacterianos podem aumentar o assentamento de esporos de algas e outros macroorganismos, desencadeando também, o processo de bioincrustação. De acordo com os autores, as algas e as bactérias coexistem em uma camada de incrustação e mantêm uma associação extremamente próxima

umas com as outras. Segundo Dong et al. [17], a interação mutualística da bactéria *Bacillus altitudinis* e da alga *Phaeodactylum tricornutum* quadruplicou a taxa de CO em comparação com o efeito individual dos organismos. Um estudo interessante conduzido por Chen et al. [18] avaliou um outro aspecto relacionado às microalgas. Os autores demonstraram que três microalgas marinhas *Synechococcus* sp., *Chlorella* sp. e *Thalassiosira* sp. apresentaram efeitos anticorrosivo em aço carbono submerso em meio f/2 por 16 dias. Segundo os autores, no 16º dia, a ação anticorrosiva das microalgas *Thalassiosira* sp., *Chlorella* sp. e *Thalassiosira* sp. apresentaram uma taxa de 80,78%, 70,80% e 69,38%. Mas a eficiência da inibição diminuiu com o tempo. Mesmo assim, os autores reforçam que a inibição biológica da corrosão ainda é discutida e a eficácia e capacidade de diferentes classes de microalgas para inibir a corrosão metálica permanecem questionáveis.

2.2. Utilização de microalgas marinhas como biomarcadores

As microalgas são consideradas bons modelos para bioensaios de ecotoxicidade por estarem situadas no primeiro nível da cadeia trófica, assim, caso ocorra qualquer perturbação nestes organismos, serão esperados potenciais efeitos a biodiversidade, estrutura e função de níveis tróficos superiores em ecossistemas aquáticos [19,20]. Bioensaios com microalgas classicamente envolvem a medição de parâmetros como taxa de crescimento, biomassa ou teor de clorofila [21]. A sensibilidade e a resposta das microalgas aos compostos antropogênicos variam de espécie para espécie. Contudo, é consenso que células algáceas são capazes de produzir moléculas específicas ou aumentar atividades enzimáticas específicas em resposta ao estresse causado pela presença de substâncias que lhes são tóxicas [21,22].

Ru et al. [23] avaliaram o efeito no crescimento celular da microalga *Chlorella* sp. exposta ao biocida 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolinona-3-ona (DCOIT) na concentração de 50 µg/L por um período de 15 dias. Segundo os autores, o DCOIT promoveu inibição na concentração celular da microalga por um período de 12 dias, contudo, entre o 13º e 14º dia do experimento, a concentração celular mensurada foi superior ao valor determinado no controle. Tal fato está em acórdância com a taxa de degradação de meia-vida do biocida que varia entre <1 dia a 13,1 dias. O biocida DCOIT pode se difundir pelas paredes e membranas celulares, ligando-se a proteínas e enzimas, bloqueando a atividade em biofilmes em organismos-alvo e não-alvo. No entanto, alguns estudos sinalizam que o DCOIT encapsulado em nanocápsulas de sílica pode apresentar atividade anti-incrustante e anti-corrosiva e ao mesmo tempo diminuir a toxicidade para organismos não-alvo [24].

Atualmente, várias novas abordagens ecológicas estão sendo testadas em todo o mundo para diminuir a toxicidade de biocidas em espécies não incrustantes, como o encapsulamento/imobilização de biocidas disponíveis comercialmente, a fim de obter controle sobre a taxa de lixiviação. Nassif et al. [25] desenvolveram hidrogéis de alginato de cálcio (Ca), zinco (Zn) e cobre (Cu), além de hidrogéis mistos de alginato de Ca/Cu e Ca/Zn com o objetivo de investigar suas propriedades antimicrobianas contra o crescimento de *Halophora coffeaeformis* e *Cylindrotheca closterium*, consideradas pioneiras no processo de colonização de superfícies, formação de biofilme e biocorrosão. Segundo os autores, muito embora todos os materiais testados tenham apresentado elevada inibição de adesão, cerca de 80%, o composto misto Ca/Zn protegeu a superfície bloqueando a adesão das microalgas, assim como, apresentou uma baixa toxicidade, propriedade essencial para um material anti-incrustante e anti-corrosivo.

Avelelas et al. [26] conduziram um estudo com dois biocidas, piritionato de zinco (ZnPT) e piritionato de cobre (CuPT), dois materiais nanoestruturados descarregados (sílica-SiNC e hidróxido duplo lamelar-LDH) e quatro nanomateriais carregados com os biocidas (LDH-ZnPT, LDH-CuPT, SiNC-ZnPT e SiNC-CuPT) nas concentrações de 10 µg/L a 100 mg/L utilizando a microalga verde *Tetraselmis chuii* (espécie não-alvo) e a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* (espécie alvo). O composto CuPT foi mais tóxico que ZnPT para a espécie não-alvo. O LDH sem carga apresentou baixa toxicidade para ambas as espécies ($IC_{50} > 100.000$ µg/L). SiNC e LDH carregados com CuPT foram muito eficientes contra o crescimento da diatomácea, no entanto, a toxicidade aguda também foi observada para as espécies não-alvo. Em adição, o composto LDH-ZnPT apresentou menor toxicidade contra as espécies fotossintéticas ($IC_{50} = 1970$ µg/L e 3870 µg/L para *P. tricornutum* e *T. chuii*, respectivamente), comparativamente ao SiNC-ZnPT.

2.3. Biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT)

O biocida 2-mercaptobenzotiazol (MBT) pertence ao grupo dos benzotiazóis (BT), grupo este que possui, aceleradores de vulcanização, inibidores de corrosão, biocidas, estabilizadores de luz UV em têxteis e plásticos e precursores na produção de diversos tipos de farmacêuticos [27]. Os BTs apresentam riscos para a saúde tanto humana, por serem produtos cancerígenos, sensibilizadores dérmicos, alergênicos e causam irritação do trato respiratório [28-32], quanto a saúde de várias espécies marinhas como peixes, plantas aquáticas e invertebrados a depender da concentração que esses seres foram expostos [33,34].

O MBT é usado geralmente como um inibidor de corrosão (IC) para vários materiais, como aço e cobre puro, devido aos seus heteroátomos serem absorvidos na superfície, formando uma camada de proteção anticorrosiva [35,36]. Essa proteção ocorre devido às suas propriedades biocidas que impedem o crescimento bacteriano, que é um dos fatores da biocorrosão [37]. Este composto também é usado na indústria de processamento de borracha como aceleradores de vulcanização, que por fim são descartados junto com a água [38].

De acordo com Krainara et al. [39] MBT e BT podem ser usados por bactérias como fonte de carbono e/ou nitrogênio, assim sendo degradados por elas. Bactérias como *Rhodococcus rhodochrous*, *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas putida*, foram descritas podendo degradar MBTs ou BTs, a capacidade de degradação varia 80-90% a depender da bactéria, composto e condições [40-42].

2.4. Biocida Gluconato de Sódio (SG)

O Gluconato de Sódio (SG) é um biocida e IC já utilizado em ligas de aço, ferro, alumínio e latão [43-46]. Este IC orgânico, derivado do ácido glucônico, pode também ser utilizado na área têxtil, em impressões e em superfícies metálicas, em especial, locais de tratamento de água [47].

Um experimento de Li et al. [48] aponta que o SG se mostra efetivo contra a corrosão inicial, principalmente ao suprimir a reação anódica ao criar um filme protetor na superfície das ligas metálicas tratadas com o SG.

2.5. Hidróxido duplo lamelar (LDH)

O Hidróxido Duplo Lamelar (LDH, do inglês *Layered Double Hydroxides*), também conhecido na literatura como argila aniônica, são minerais que possuem uma multifuncionalidade magnética, óptica, eletrônica, iônica, química e estrutural por conta de suas camadas hidróxidos duplos com ânions interlamelares, podendo ser usado estando em vários estados diferentes como pó, grão, disperso em sólidos ou líquidos. Como dito, por possuírem uma grande capacidade de mudança em sua composição, podemos criar várias combinações químicas nas camadas lamelares quanto ao ânion intercalado e a quantidade de água na estrutura do composto assim recebendo um novo nome referente ao mineral e sua nova composição, por exemplo, hidrotalcita (hidroxicarbonato de magnésio e alumínio (Mg-Al LDH) [49].

Nos últimos anos, o LDH tem sido referenciado como um material promissor para aplicação em diversos setores industriais e ambientais. Estes materiais podem ser utilizados como carreadores de fármacos, suporte de catalisadores, aditivos em polímeros e componentes de biossensores. A diversidade de áreas de aplicação do LDH ocorre por três importantes fatores: versatilidade química, troca iônica e capacidade de regeneração. Sua estrutura apresenta duas lamelas carregadas positivamente, o que possibilita a criação de vários tipos de LDHs diferentes, pela variação de cátions e suas proporções na formação das lamelas e pela variação de ânions intercalados na estabilização da lamela [50-59].

Os LDHs, em sua forma nanoestruturada, já foram descritos na literatura como uma forma de armazenar os ICs, reduzindo a liberação espontânea e promovendo de forma controlada a liberação dos ICs [60].

3. Objetivos

Avaliar a toxicidade de 7 compostos sendo 2 ICs biocidas 2-mercaptobenzotiazol (MBT) e gluconato de sódio (SG), 2 NME brutos Mg-Al LDH e Zn-Al LDH e 2 NME inovadores carregados com IC Zn-Al LDH-MBT, Mg-Al LDH-MBT, Zn-Al LDH-SG sobre a microalga marinha *Chlorella minutissima*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Inibidores de Corrosão

Os compostos utilizados no presente estudo foram os biocidas IC 2-mercaptobenzotiazol (MBT) e gluconato de sódio (SG), os nanomateriais estruturados (NE) brutos (Zn-Al nanoestruturado, Zn-Al LDH; Mg-Al nanoestruturado, Mg-Al LDH) e os NE inovadores carregados com IC (Zn-Al-mercaptobenzotiazol nanoestruturado, Zn-Al LDH-MBT; Mg-Al-mercaptobenzotiazol nanoestruturado, Mg-Al LDH-MBT; Zn-Al-gluconato de sódio nanoestruturado, Zn-Al LDH-SG). Os compostos foram fornecidos pela empresa SmallMatek Ltda. em parceria com o projeto NANOGREEN.

4.2. Cultura de microalgas

A microalga marinha *Chlorella minutissima*, foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, na proporção 1:3, sendo 50 mL do inóculo, e 150 mL de meio Guillard ajustado em salinidade 35, sob uma intensidade de iluminação de luzes fluorescentes "brancas frias" de 70

$\mu\text{photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na superfície do frasco com ciclo claro:escuro de 12:12 horas a $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Diariamente, os frascos foram levemente agitados e deslocados aleatoriamente. A microalga *C. minutissima* foi crescida em meio de cultura Guillard até a fase exponencial. Após este período, a concentração celular foi ajustada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ cel/mL.

Segundo Guillard & Ryther e Guillard [61,62], o meio de cultura consiste em 5 soluções sendo: 1. Solução de Nitrato (NaNO_3 - 7,5g/100 mL de água); 2. Solução de Fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,5g/100 mL de água); 3. Solução de Silicato ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ - 3,00g/100 mL de água); 4. Solução de Metais-traço, foi preparado separadamente cada uma destas soluções primárias de metais-traço em água destilada (a. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,98g / 100 mL, b. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,20g / 100 mL, c. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1,00g / 100 mL, d. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 18,00g / 100 mL, e. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,63g / 100 mL, f. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 3,15 + EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $13,05 \times 10^{-3}$ M) - 4,36g - Ácido Etilendinitrilotetracético diluído em 900 ml de água; 5. Solução de Vitaminas, foram diluídas em alíquotas de 200 mL de água destilada cada vitamina separadamente (a. Tiamina - $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{C}_{12}\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 100 mg, b. Biotina - $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ - 0,5 mg, c. Vitamina B12 - 0,05 mg)

O pH e a salinidade foram ajustados, sendo o pH para 8 e a salinidade para 35. Após a correção destes itens foi adicionado Para cada litro de água do mar 1 mL das soluções estoque de Nitrato, Fosfato, Vitaminas, Metais-traço, Silicato e Vitaminas, pipetados com micropipeta com ponteiros autoclavados.

Este meio possui todas as condições necessárias para o crescimento da microalga *C. minutissima*.

4. 3. Ensaio de ecotoxicidade de microalgas em placas de 96 poços

Os ensaios de toxicidade dos IC de base biológica em microalgas foram realizados conforme orientações da ABNT NBR 12648:2018 [63], Dupraz et al. [64], Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) Teste N° 201 [65]. Estes métodos consistem na exposição dos organismos-teste aos diferentes tratamentos. A toxicidade foi determinada pela inibição do crescimento da biomassa algácea em microplacas de 96 poços.

Utilizando microplacas de 96 poços, foi inserido um volume de 180 μL de inóculo na fase exponencial de crescimento na concentração inicial de $1,0 \times 10^4$ cel/mL a cada poço. Um volume de 20 μL das soluções de ICs nas concentrações de 0,05; 0,14; 0,41; 1,23; 3,7; 11,1;

33,3 e 100 mg/L foram incorporados individualmente. As microalgas e a solução de AgNO_3 10 mg/L foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Nos poços periféricos foi inserida água estéril para reduzir o efeito da evaporação.

Cada composto foi disperso em meio Guillard com auxílio de um sonificador.

A inibição do crescimento foi determinada a cada 24 h com auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis, da empresa Thermo Scientific modelo Multiskan GO no comprimento de onda de 670 nm.

Os testes foram realizados em triplicata.

4. 6. Análise de Dados

Para a análise estatística foi utilizado o programa Paleontological Statistical 4.03 (Past4) e para o cálculo da concentração de inibição a 50% das células (IC_{50}), foi utilizado o programa Python. A análise das diferenças significativas entre as concentrações celulares foi aplicada uma análise de variância (ANOVA). Ao encontrar variações significativas ($p < 0,05$), foi aplicado o teste Tukey para determinar a interação entre o controle e as concentrações de cada composto nos tratamentos.

A partir do teste de Tukey, também foi analisada a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO). Sendo a CENO a maior concentração do composto testado que não causa efeito estatisticamente significativo no organismo testado e CEO o contrário, a menor concentração do composto que causa efeito estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1. Toxicidade

5.1.1. Toxicidade do MBT

As figuras 1, 2 e 3 apresentam os resultados da concentração celular (cel/mL) da microalga *C. minutissima* em função da concentração do composto MBT (mg/L). De acordo com os valores obtidos para o biocida MBT pelo teste ANOVA, 24h $p = 0,56$, 48h $p = 0,52$ e 72h $p = 0,094$, não foi observada variação significativa nos diferentes tempos de ensaio.

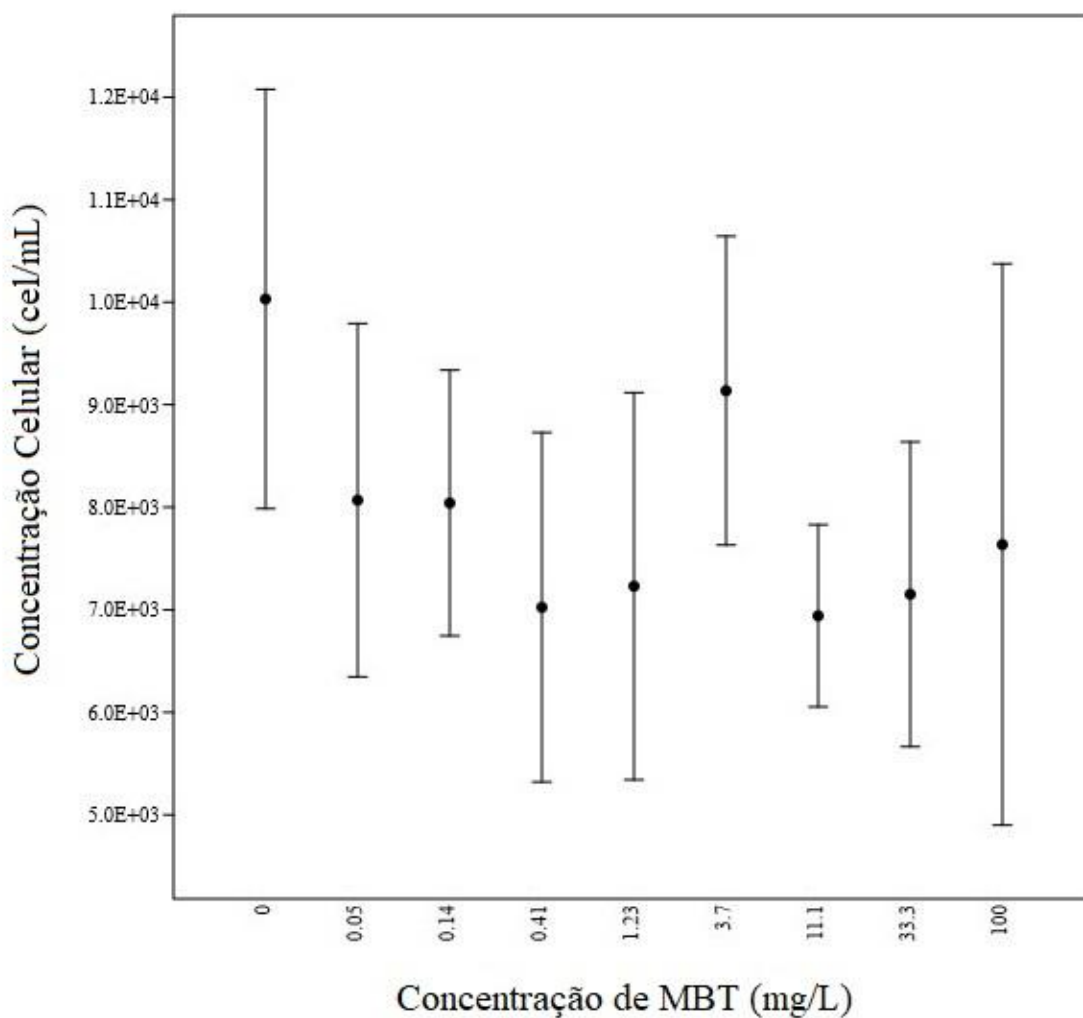


Figura 1. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto MBT (mg/L) após 24h de exposição.

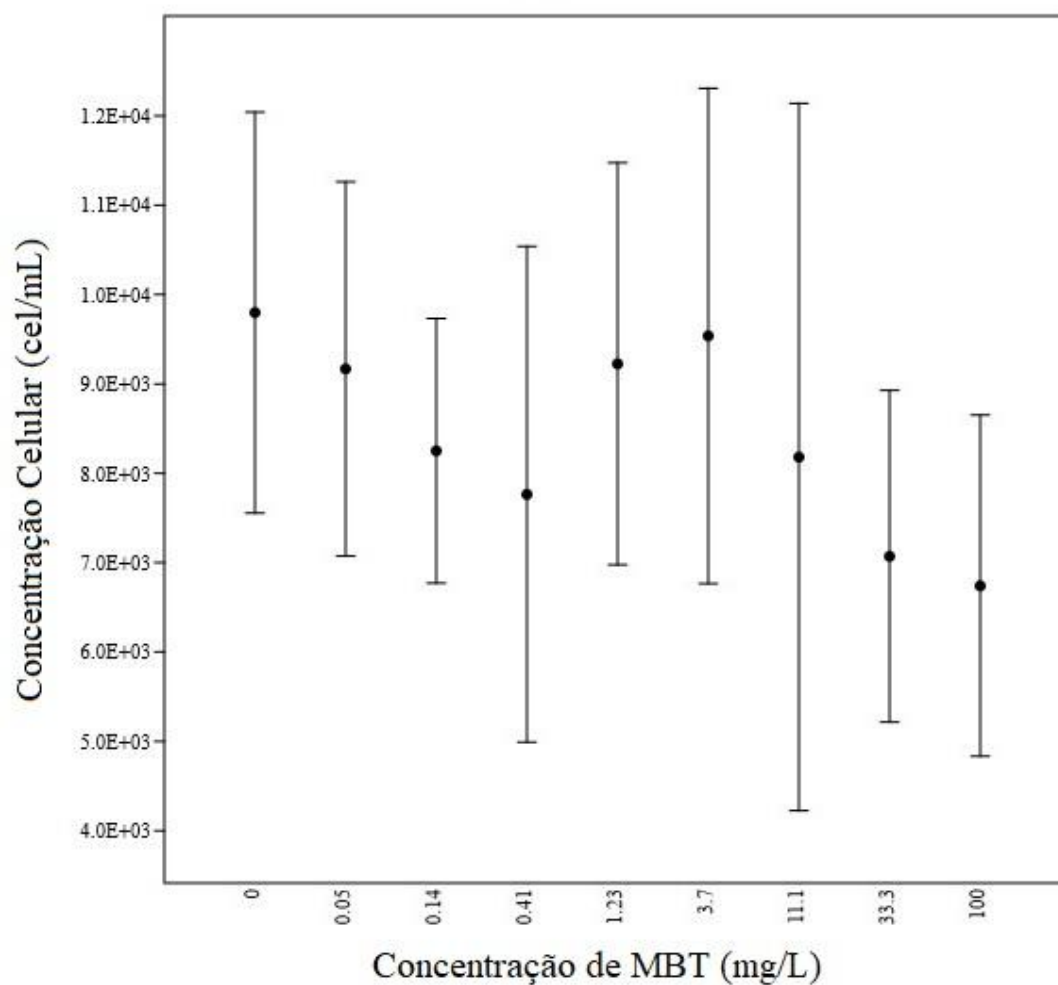


Figura 2. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto MBT (mg/L) após 48h de exposição.

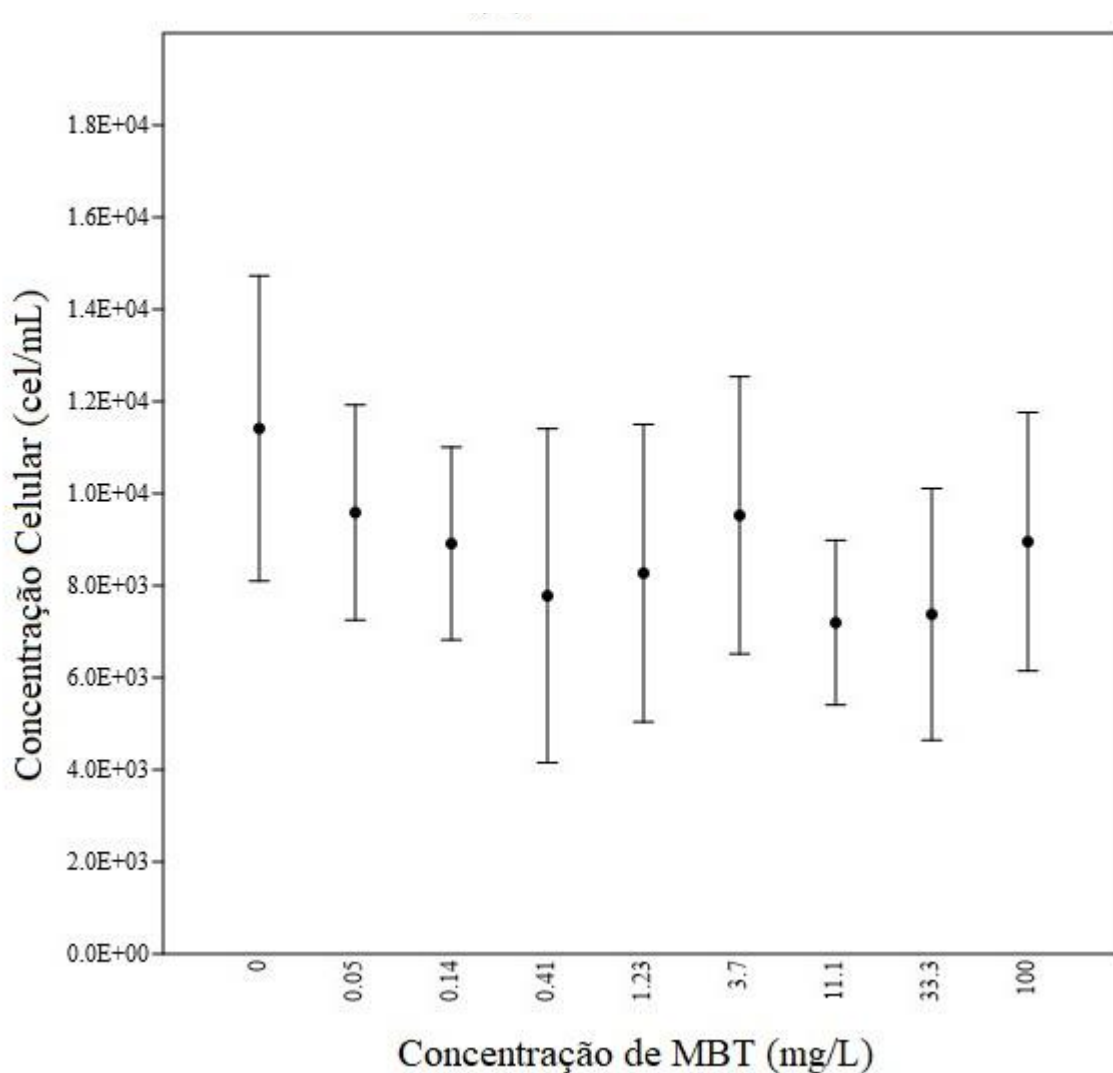


Figura 3. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto MBT (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.2. Toxicidade do SG

Conforme apresentado nas Figuras 4, 5 e 6 a concentração celular da microalga (cel/mL) quando exposta a diferentes concentrações do biocida SG apresentou variância significativa apenas no tempo de 72 h (Fig.6). Os valores de p obtidos para o composto SG pelo teste ANOVA foram em 24h $p = 0,06$, 48h $p = 0,05$, 72h $p = 0,03$.

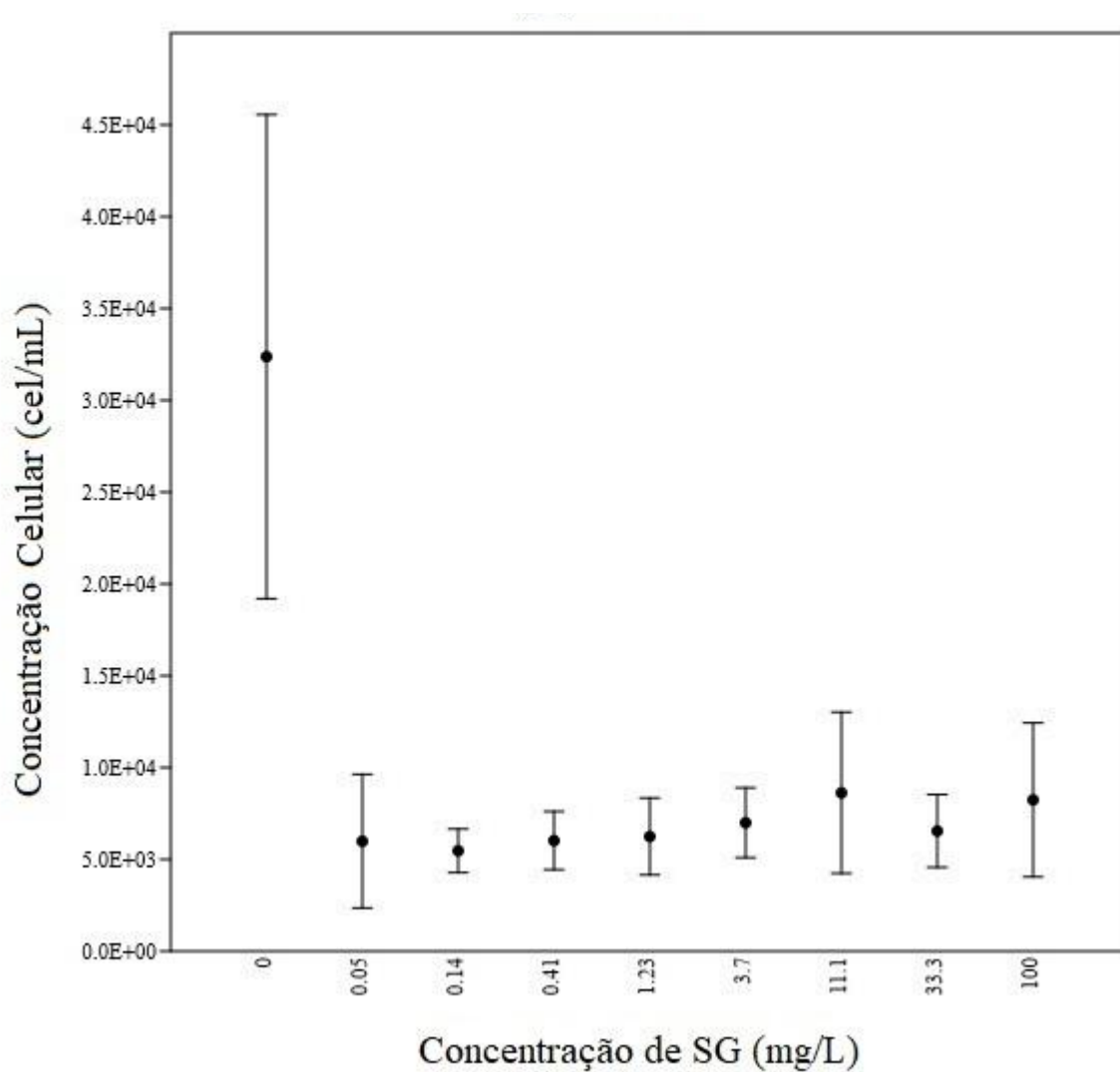


Figura 4. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto SG (mg/L) após 24h de exposição.

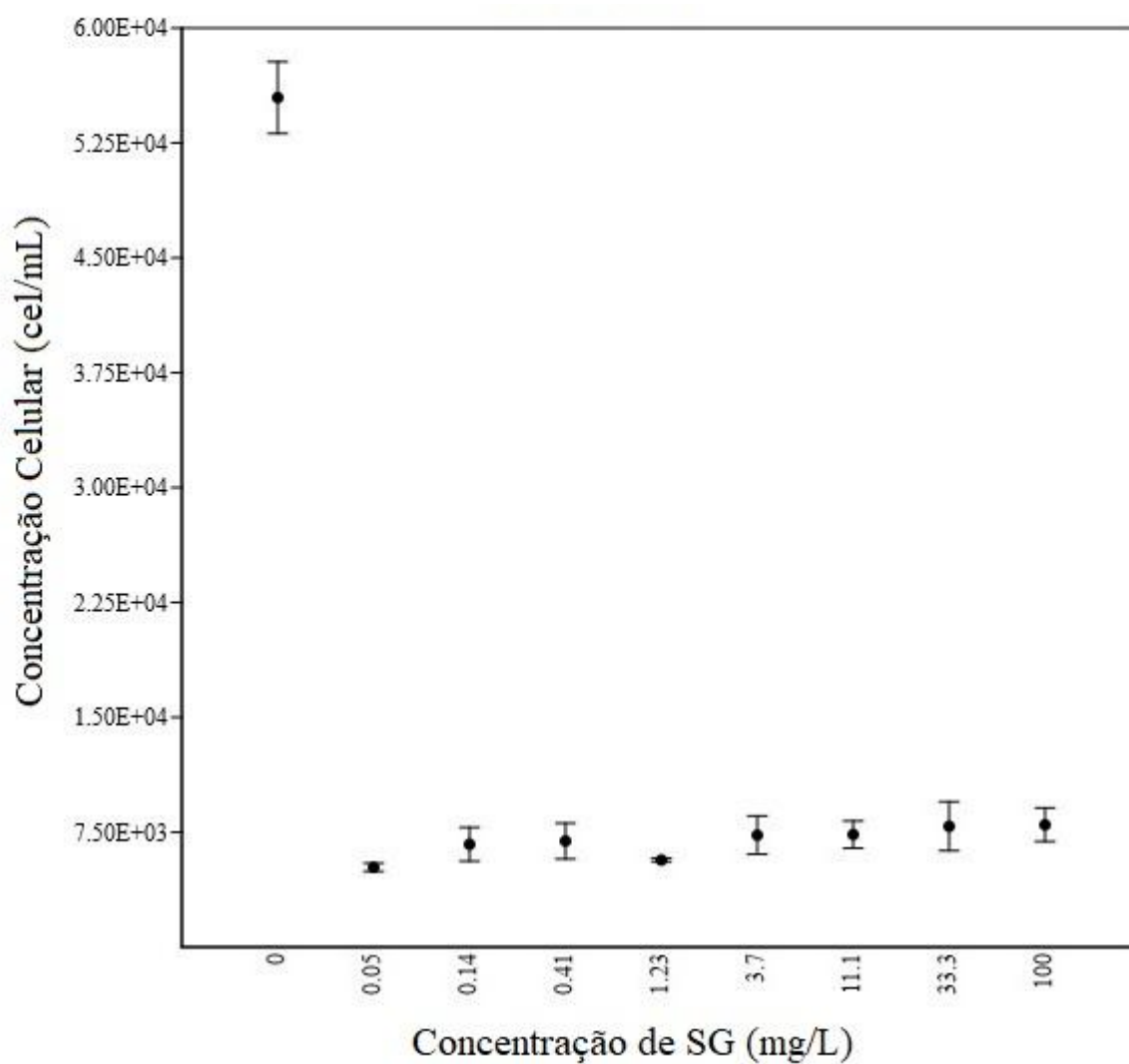


Figura 5. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto SG (mg/L) após 48h de exposição.

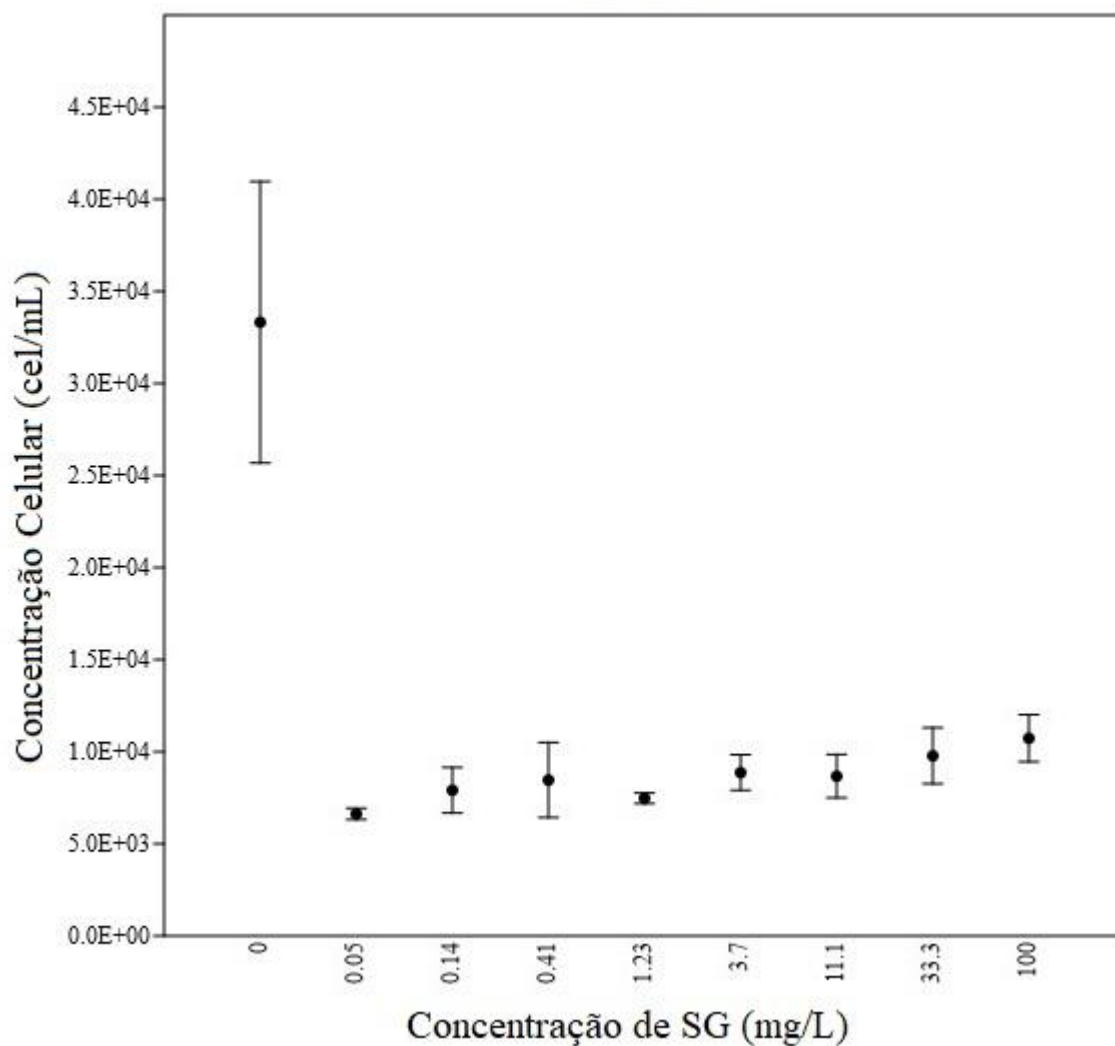


Figura 6. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto SG (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.3. Toxicidade do Zn-Al LDH

Conforme apresentado nas Figuras 7, 8 e 9 foi observada variância significativa em todos os tempos de exposição de *C. minutissima* a diferentes concentrações de Zn-Al LDH. Os valores de p obtidos pelo teste ANOVA foram 24h $p = 0,03$, 48h $p = 0,03$ e 72h $p = 0,03$.

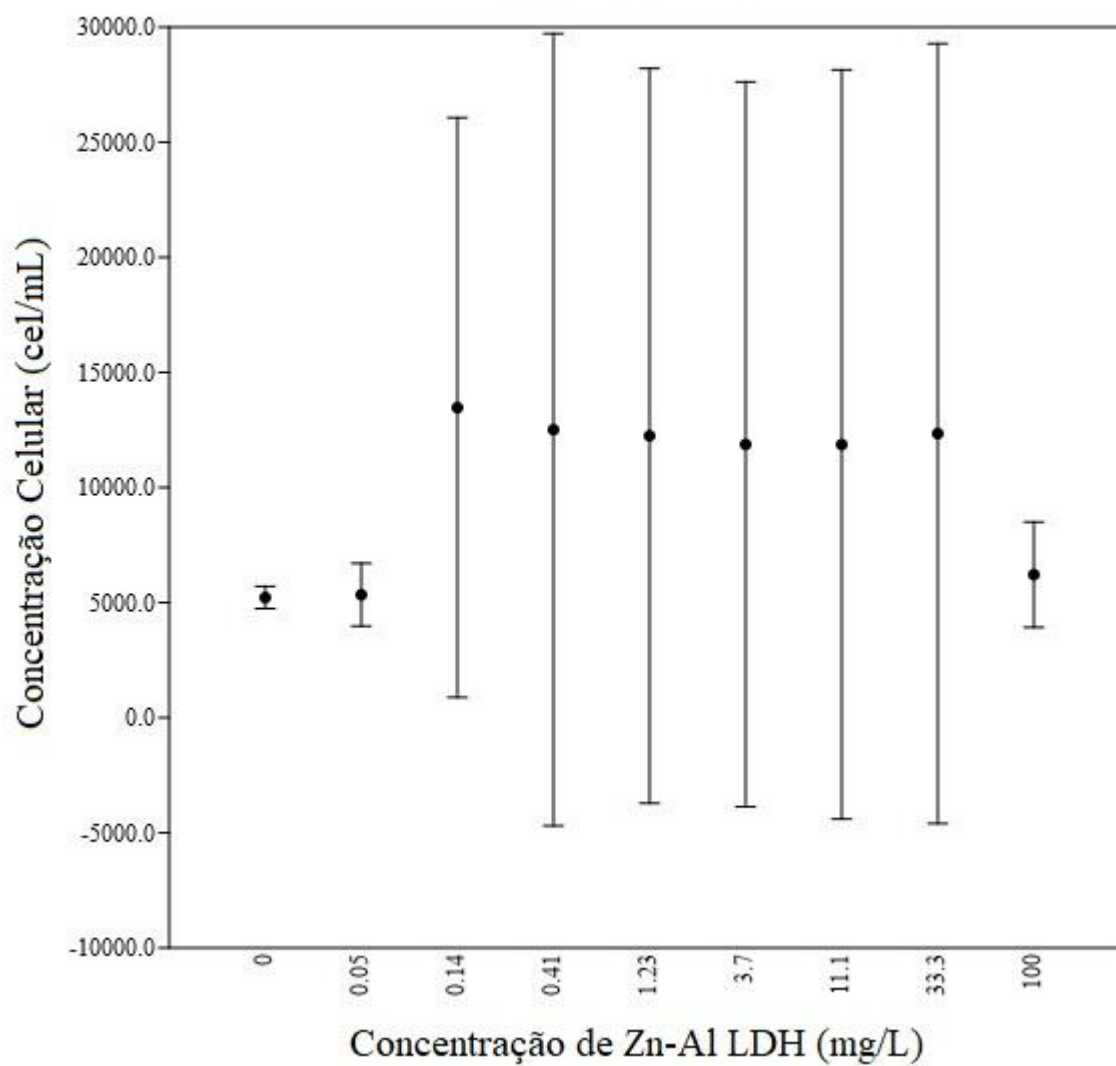


Figura 7. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH (mg/L) após 24h de exposição.

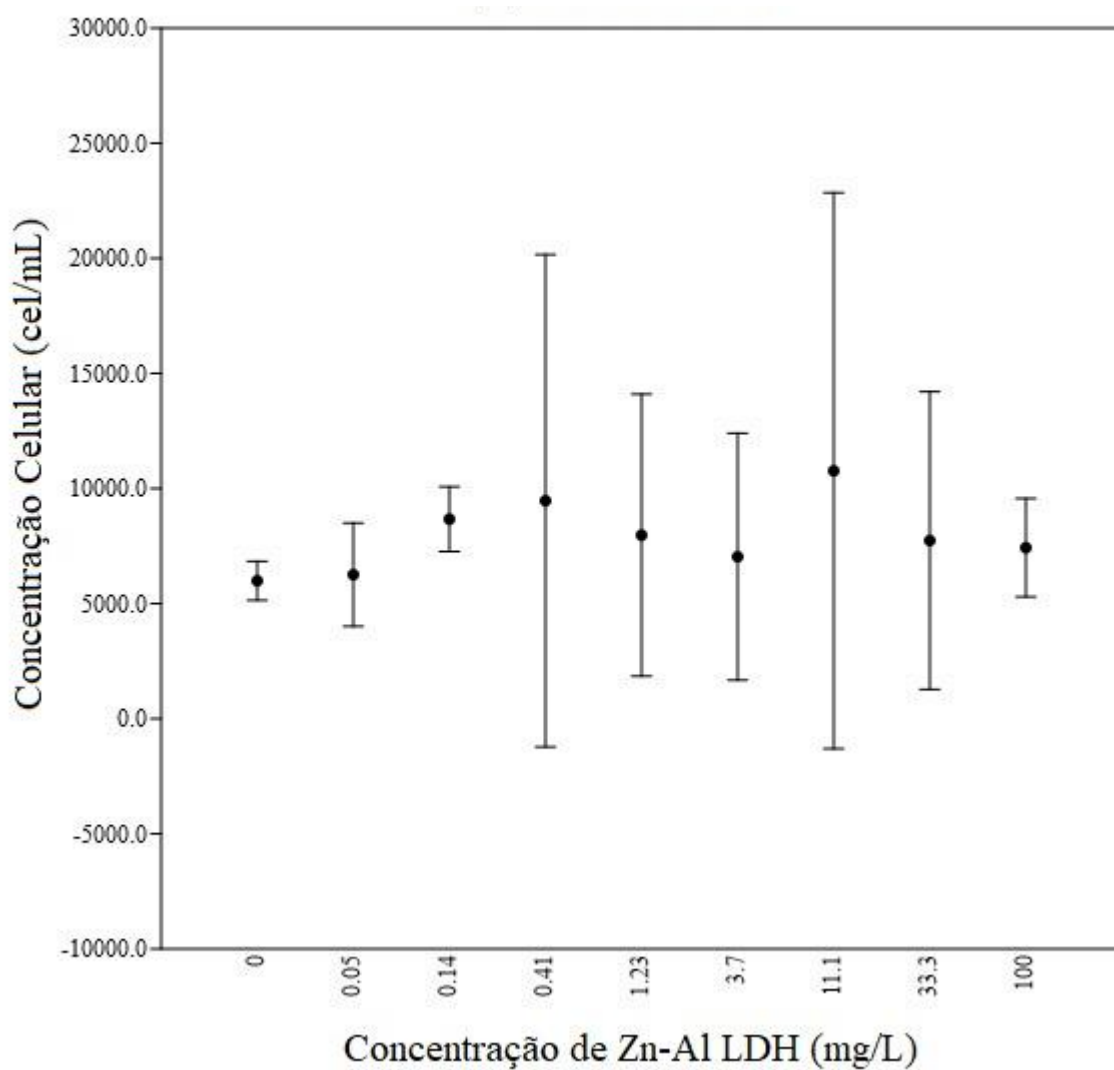


Figura 8. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH (mg/L) após 48h de exposição.

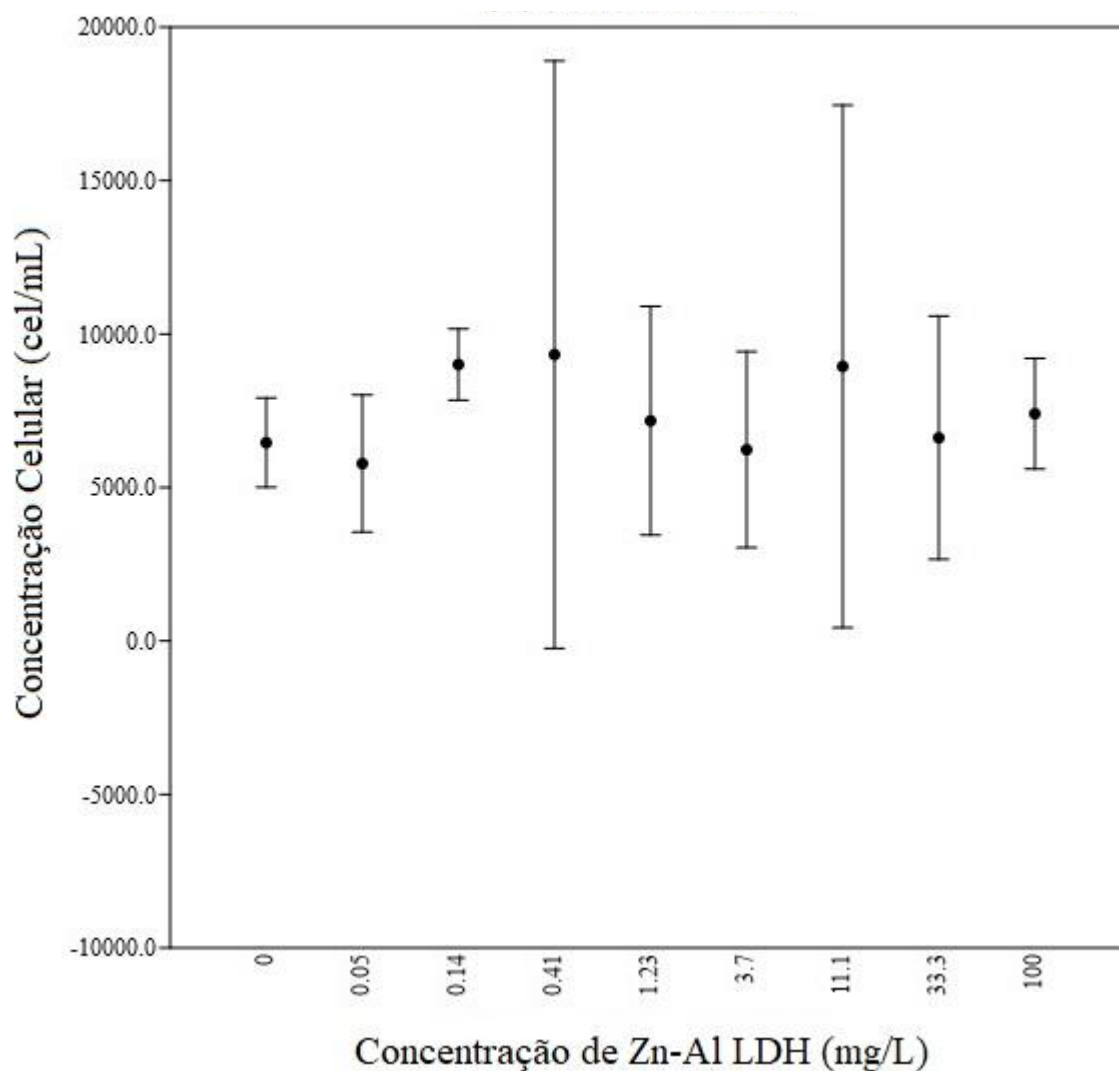


Figura 9. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.4. Toxicidade do Mg-Al LDH

A exposição da microalga ao composto Mg-Al LDH não apresentou variância significativa (Fig. 10, 11 e 12) durante as 72 h de exposição. Os valores de p obtidos pelo teste ANOVA foram em 24h $p = 0,43$, 48h $p = 0,06$ e 72h $p = 0,49$.

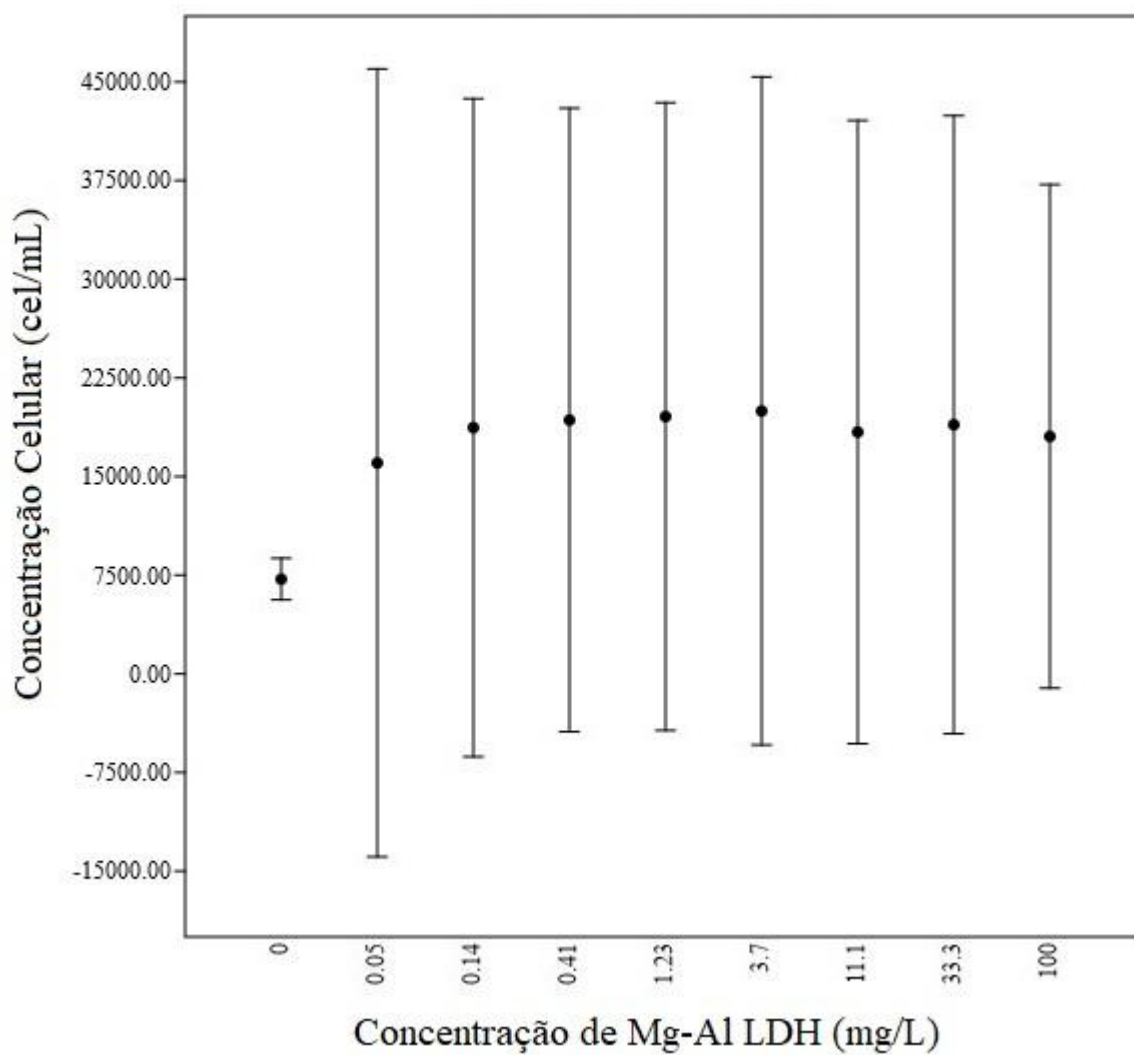


Figura 10. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH (mg/L) após 24h de exposição.

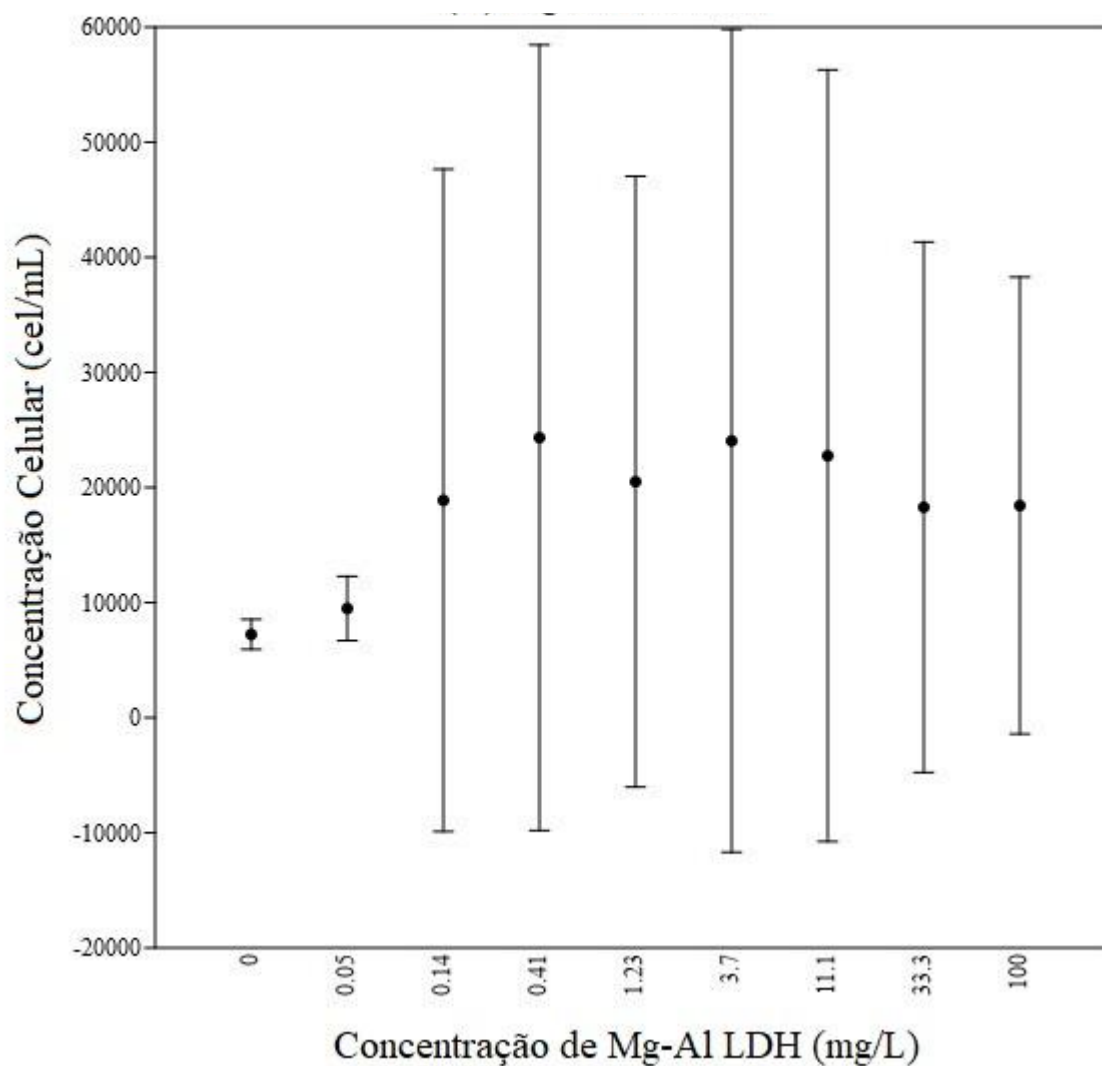


Figura 11. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH (mg/L) após 48h de exposição.

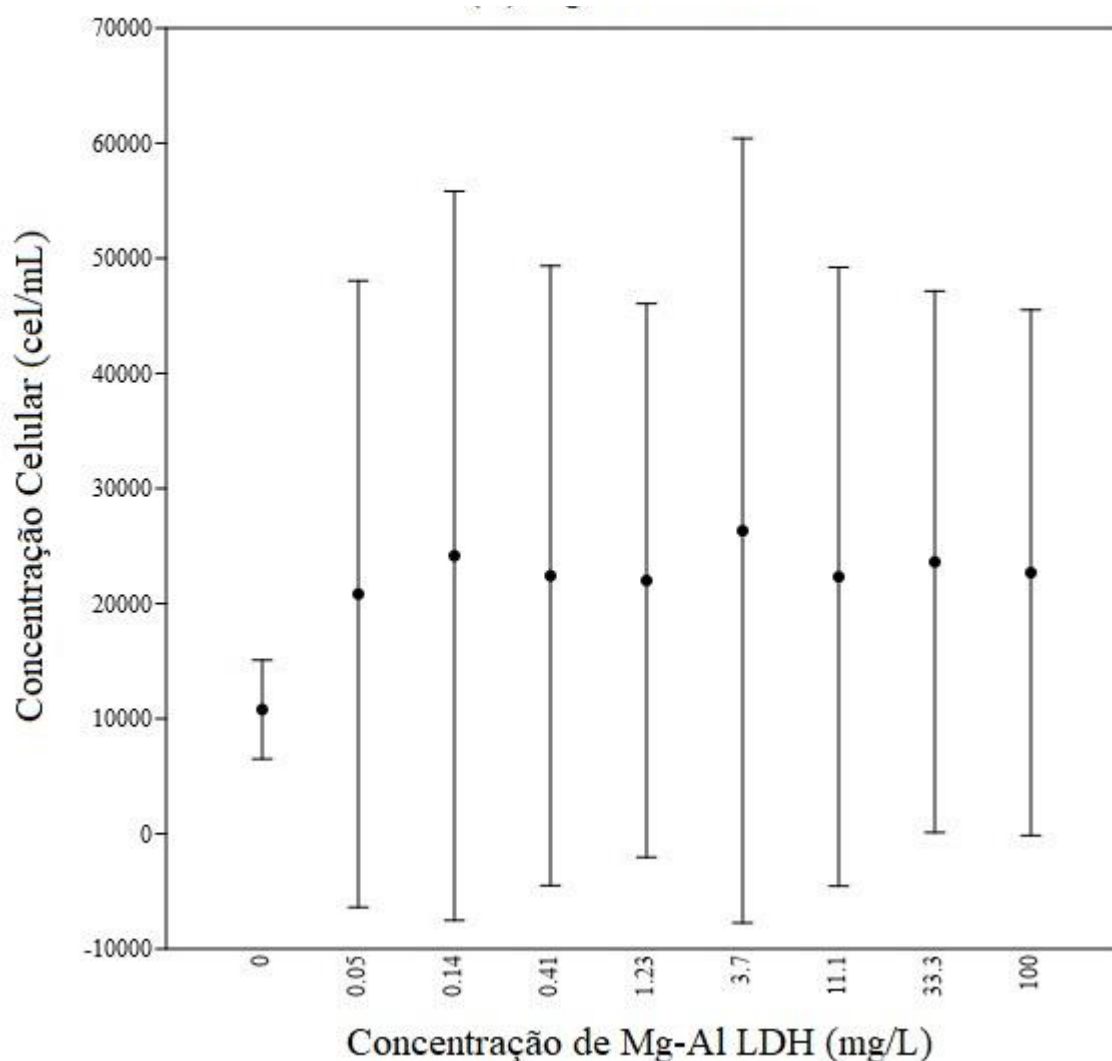


Figura 12. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.5. Toxicidade do Zn-Al LDH-MBT

As figuras 13, 14 e 15 apresentam o perfil de crescimento celular de *C. minutissima* expostas ao composto Zn-Al LDH-MBT por um período de 72h. De acordo com os resultados obtidos, foi somente observada variância significativa apenas no tempo de 24h (Fig.13). Os valores de p determinados pelo teste ANOVA foram em 24h $p = 3,575 \times 10^{-14}$; 48h $p = 0,06$; 72h $p = 0,09$.

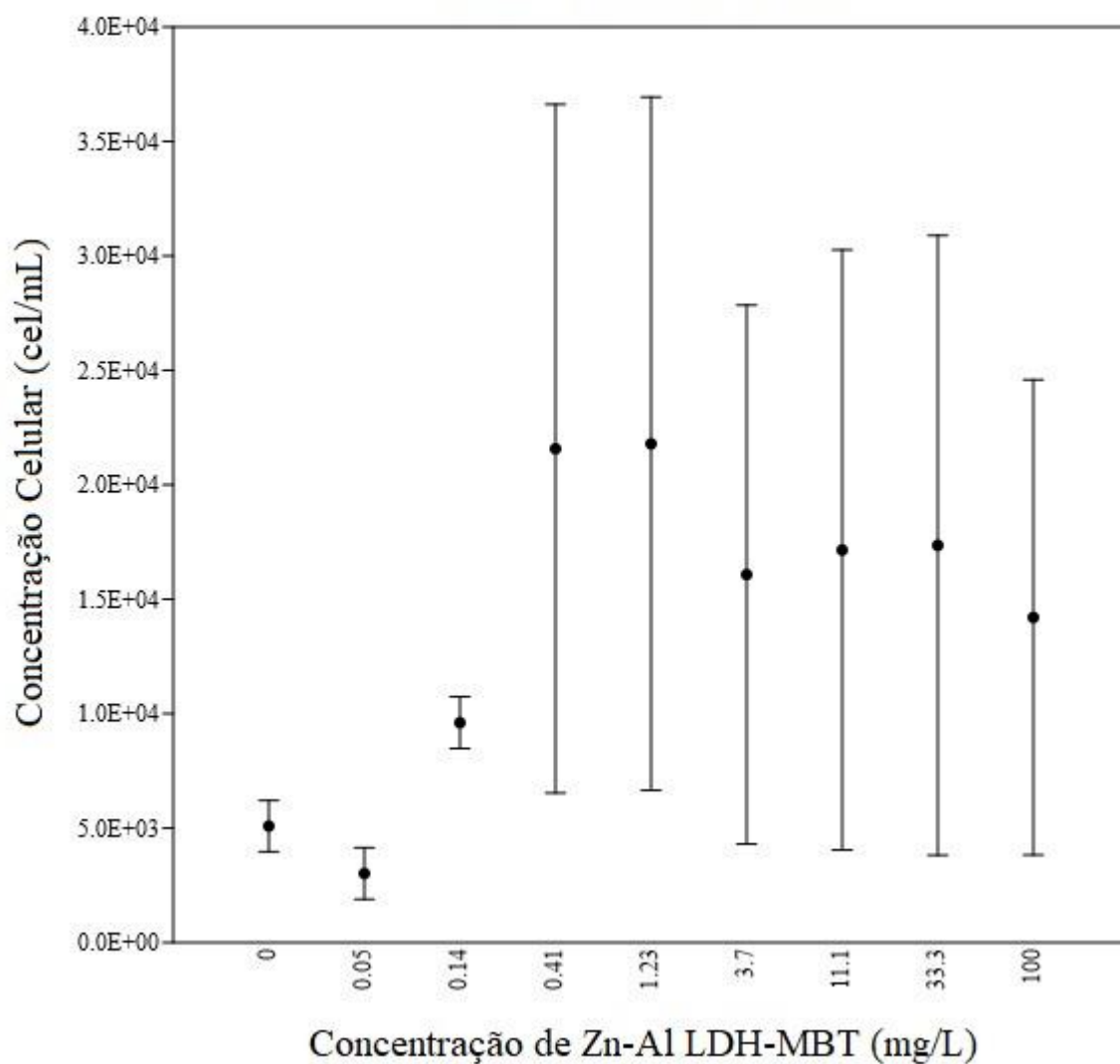


Figura 13. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-MBT (mg/L) após 24h de exposição.

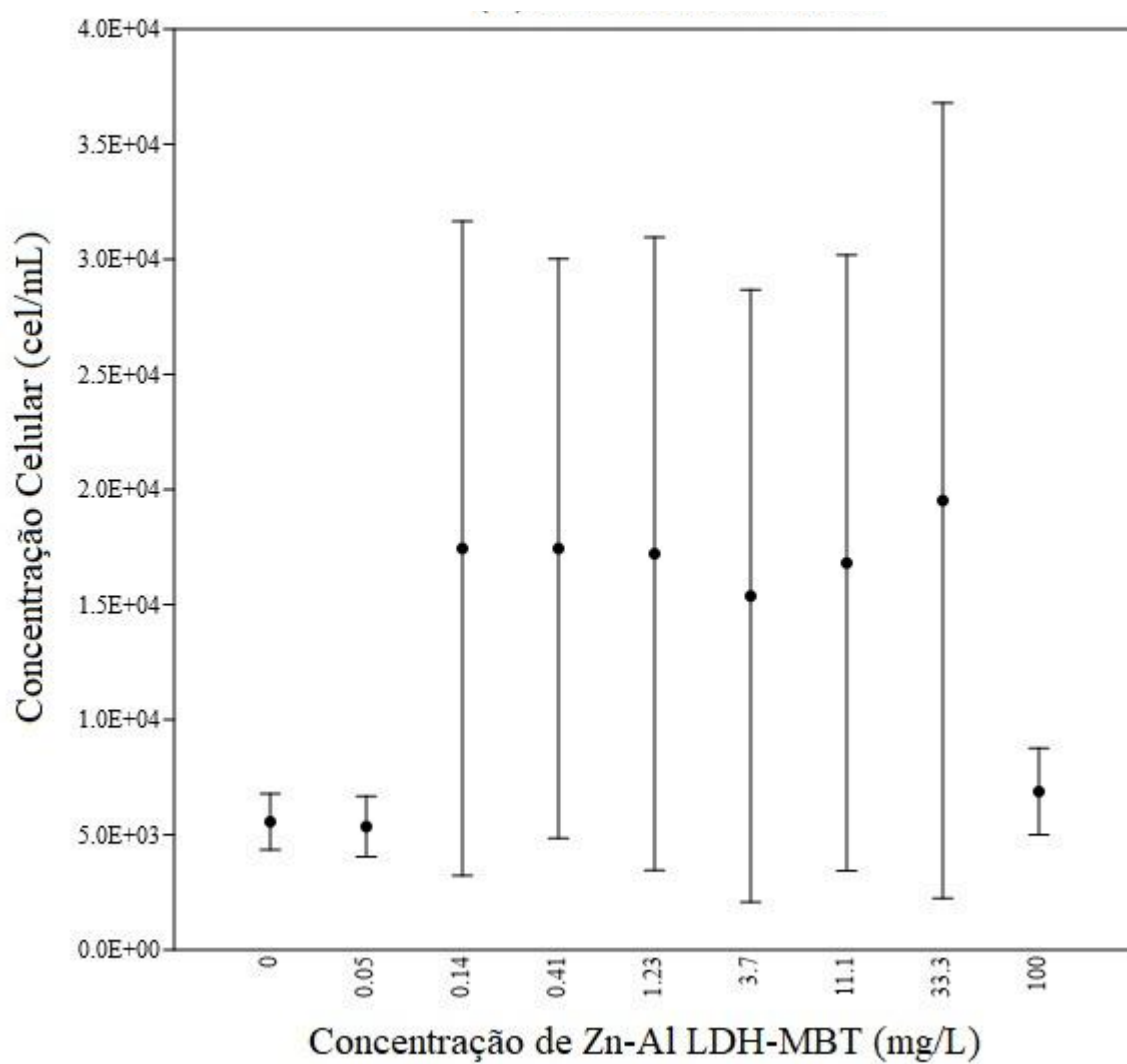


Figura 14. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-MBT (mg/L) após 48h de exposição.

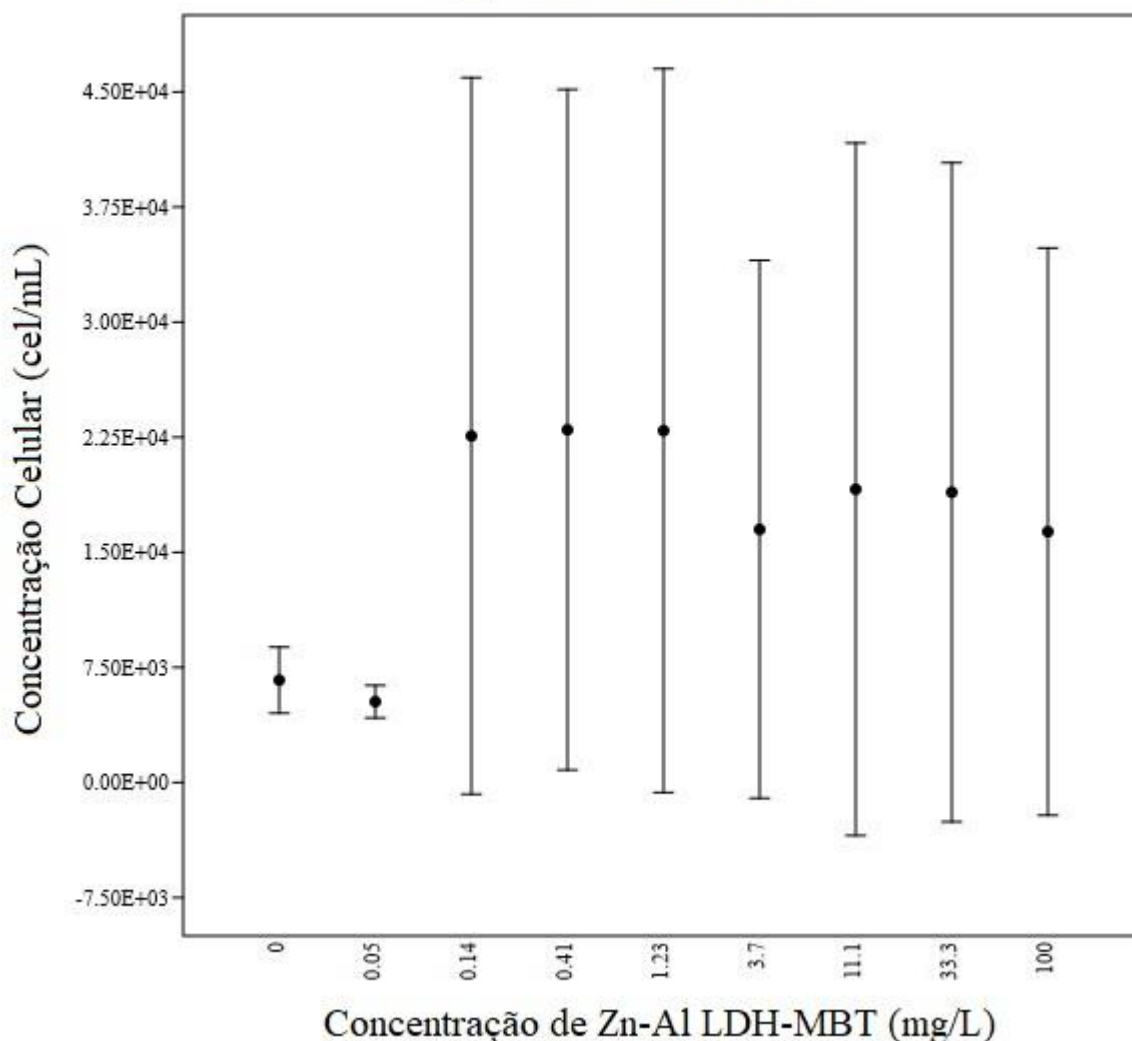


Figura 15. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-MBT (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.6. Toxicidade do Mg-Al LDH-MBT

As figuras 16, 17 e 18 apresentam potenciais efeitos da exposição de *C. minutissima* a diferentes concentrações do composto Mg-Al LDH-MBT. Conforme os valores de p obtidos pelo teste ANOVA em 24h $p = 0,06$, 48h $p = 0,06$ e 72h $p = 0,01$, foi identificada variância significativa apenas no tempo de 72h.

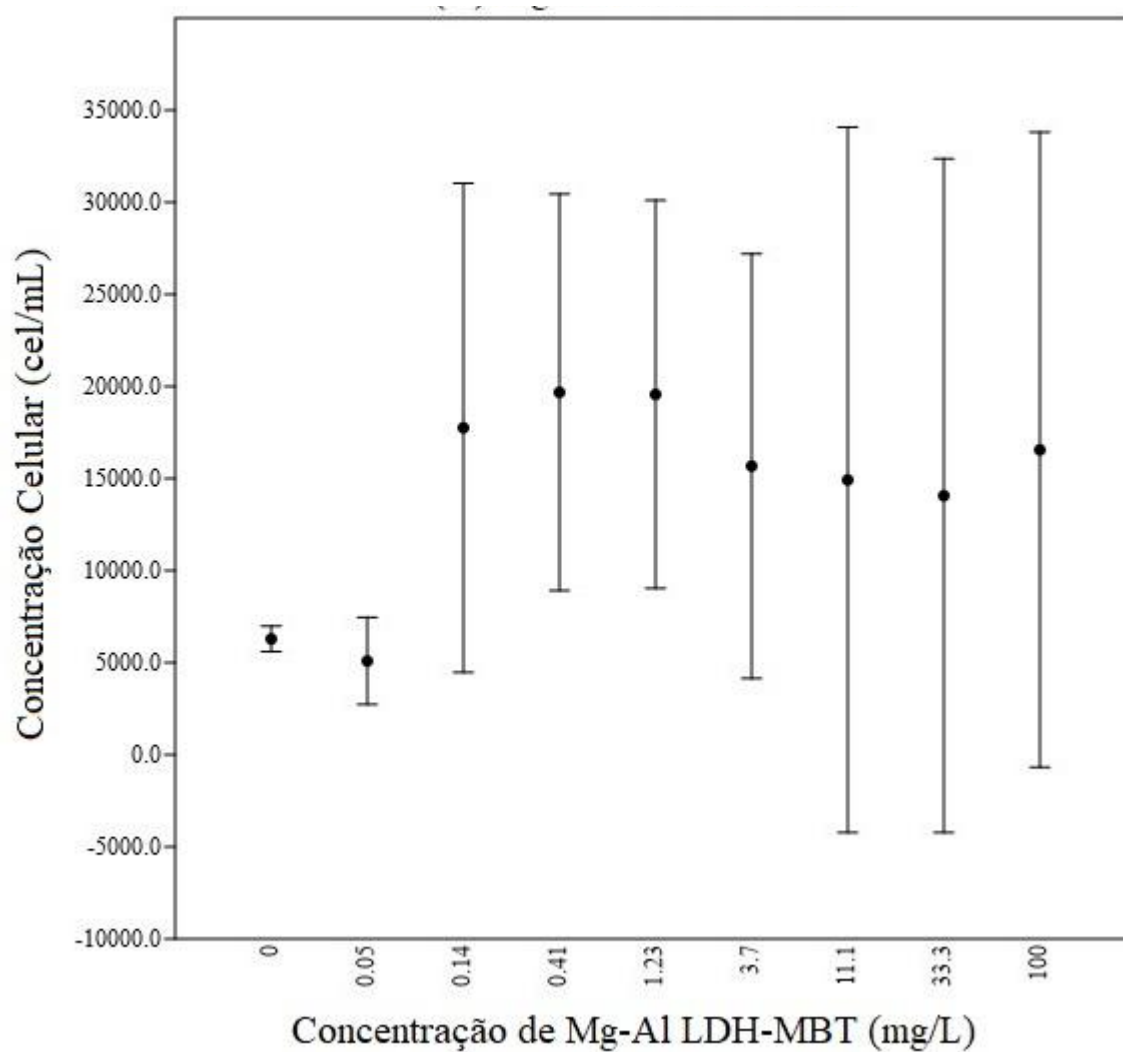


Figura 16. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH-MBT (mg/L) após 24h de exposição.

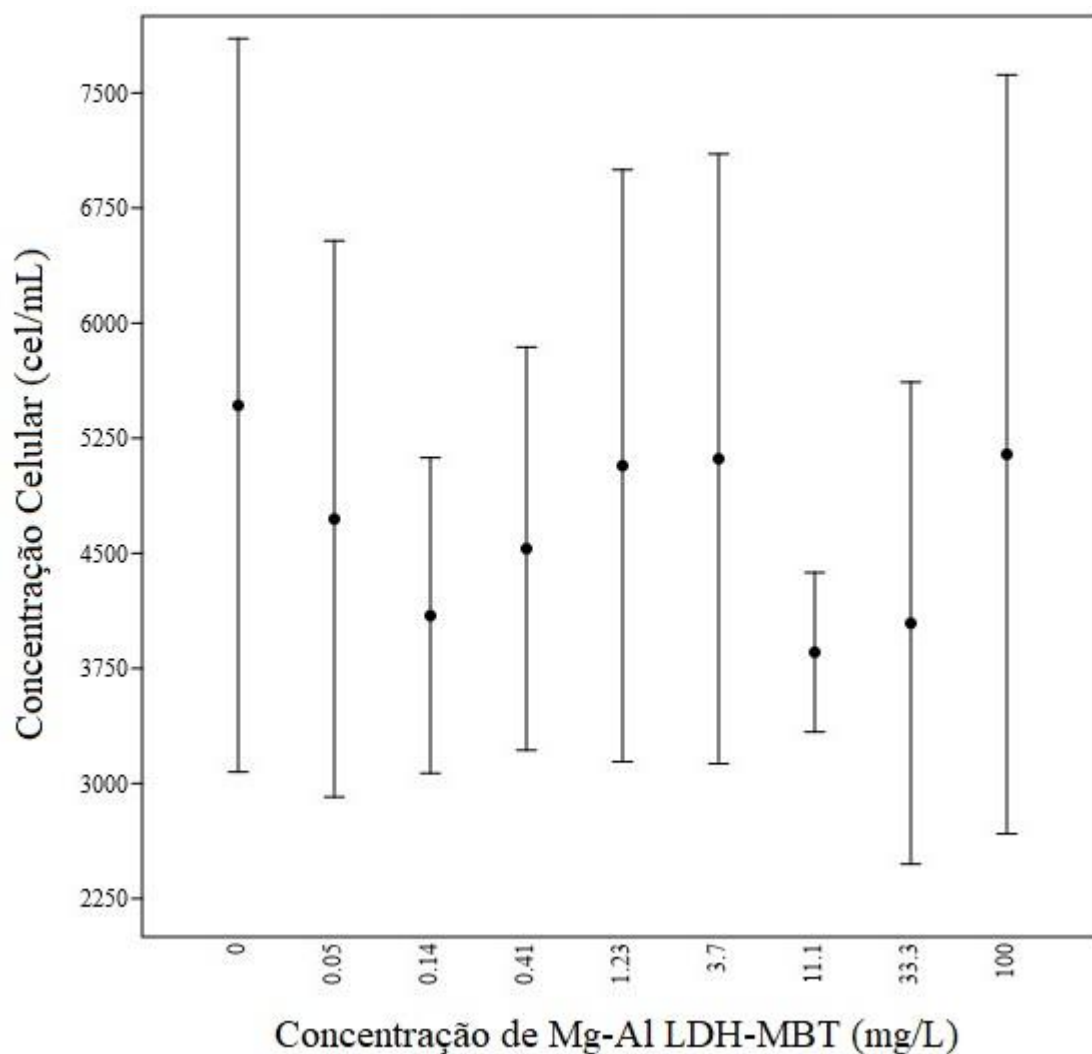


Figura 17. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH-MBT (mg/L) após 48h de exposição.

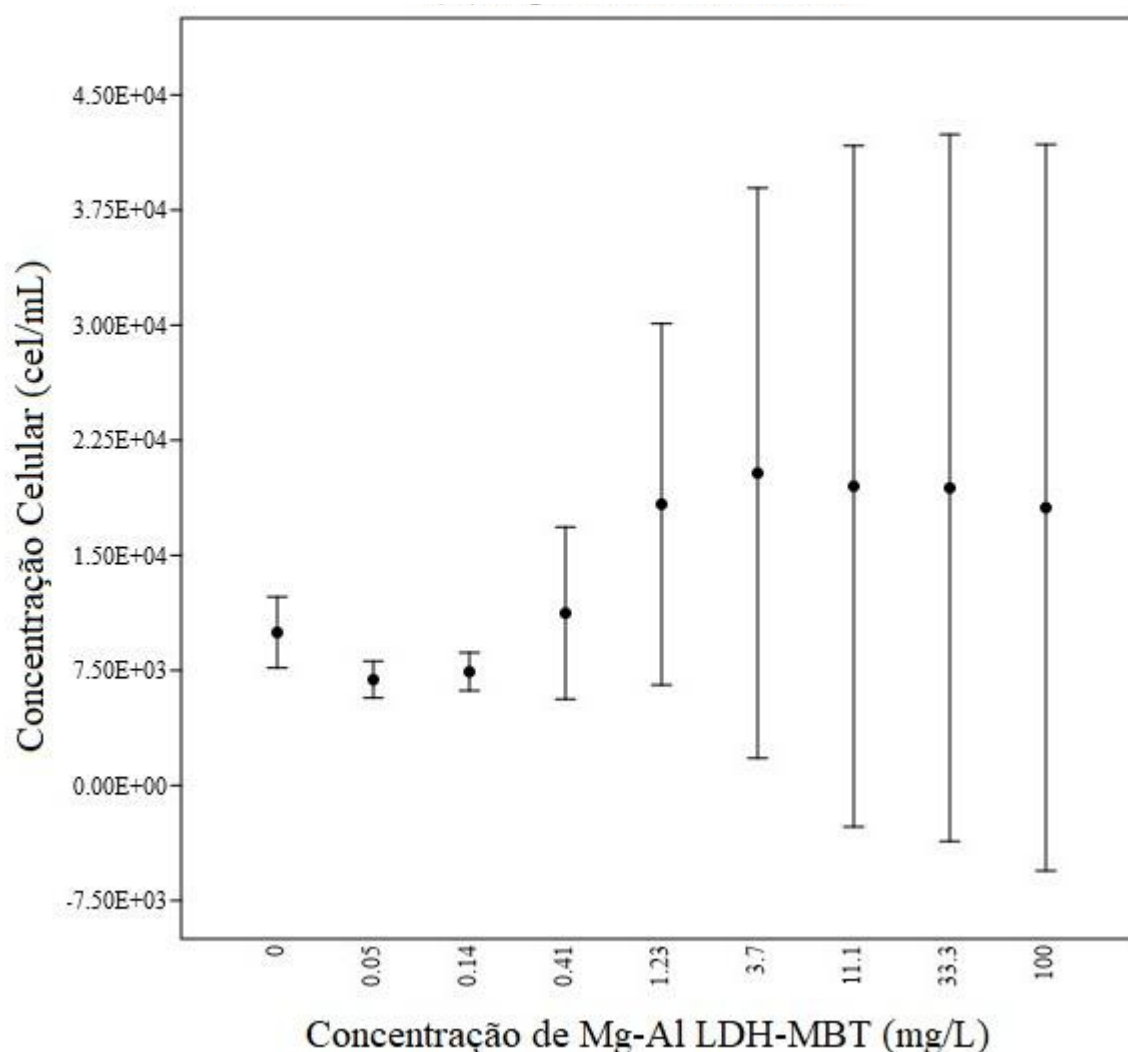


Figura 18. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Mg-Al LDH-MBT (mg/L) após 72h de exposição.

5.1.7. Toxicidade do Zn-Al LDH SG

De acordo com o apresentado nas figuras 19, 20 e 21 o composto Zn-Al LDH SG, quando exposto a microalga *C. minutissima* apresentou variância significativa nos em todos os tempos de exposição. Os valores de p obtidos pelo teste ANOVA foram 24h $p = 1,11 \times 10^{-5}$, 48h $p = 0,03$, 72h $p = 0,03$.

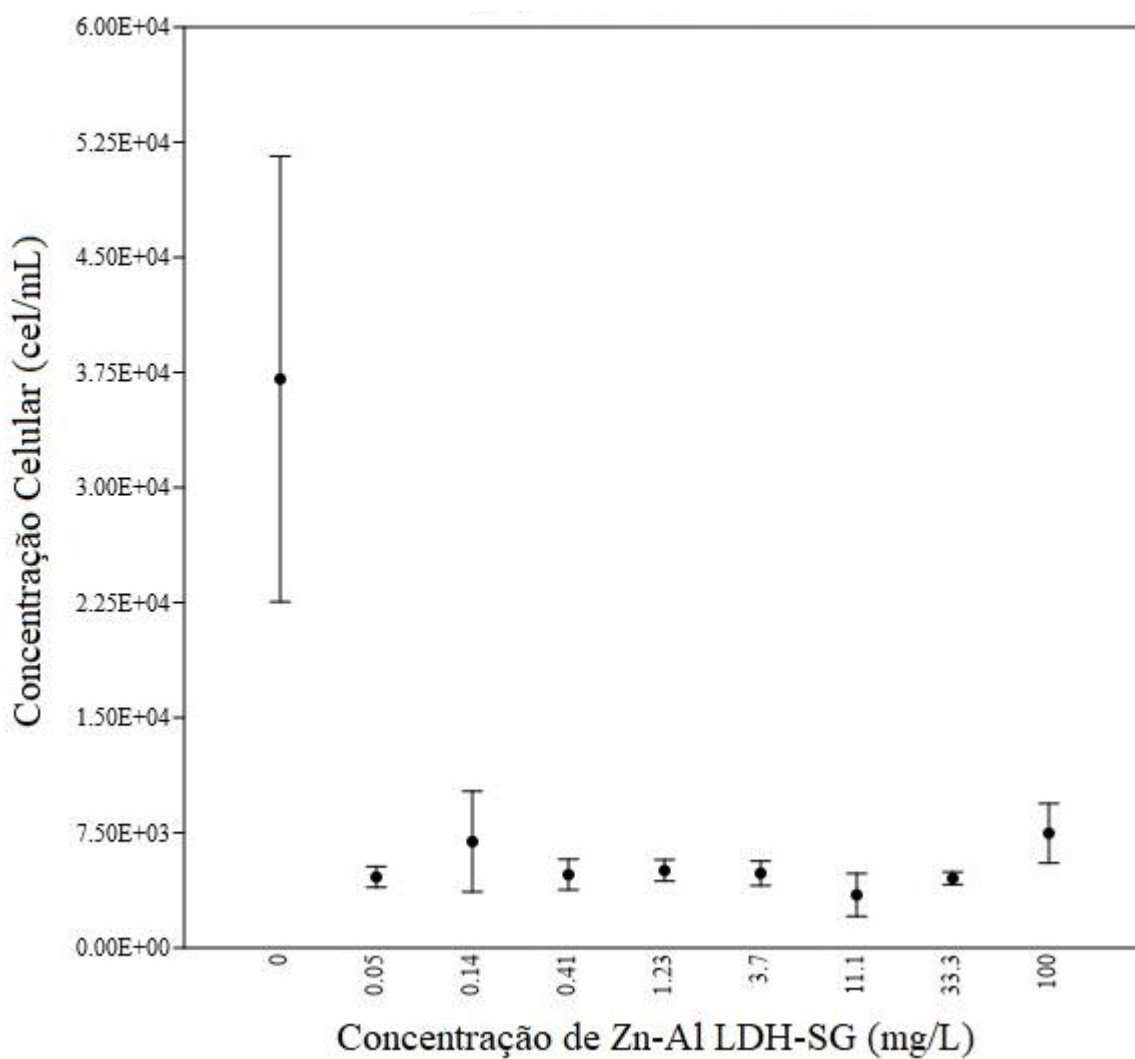


Figura 19. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-SG (mg/L) após 24h de exposição.

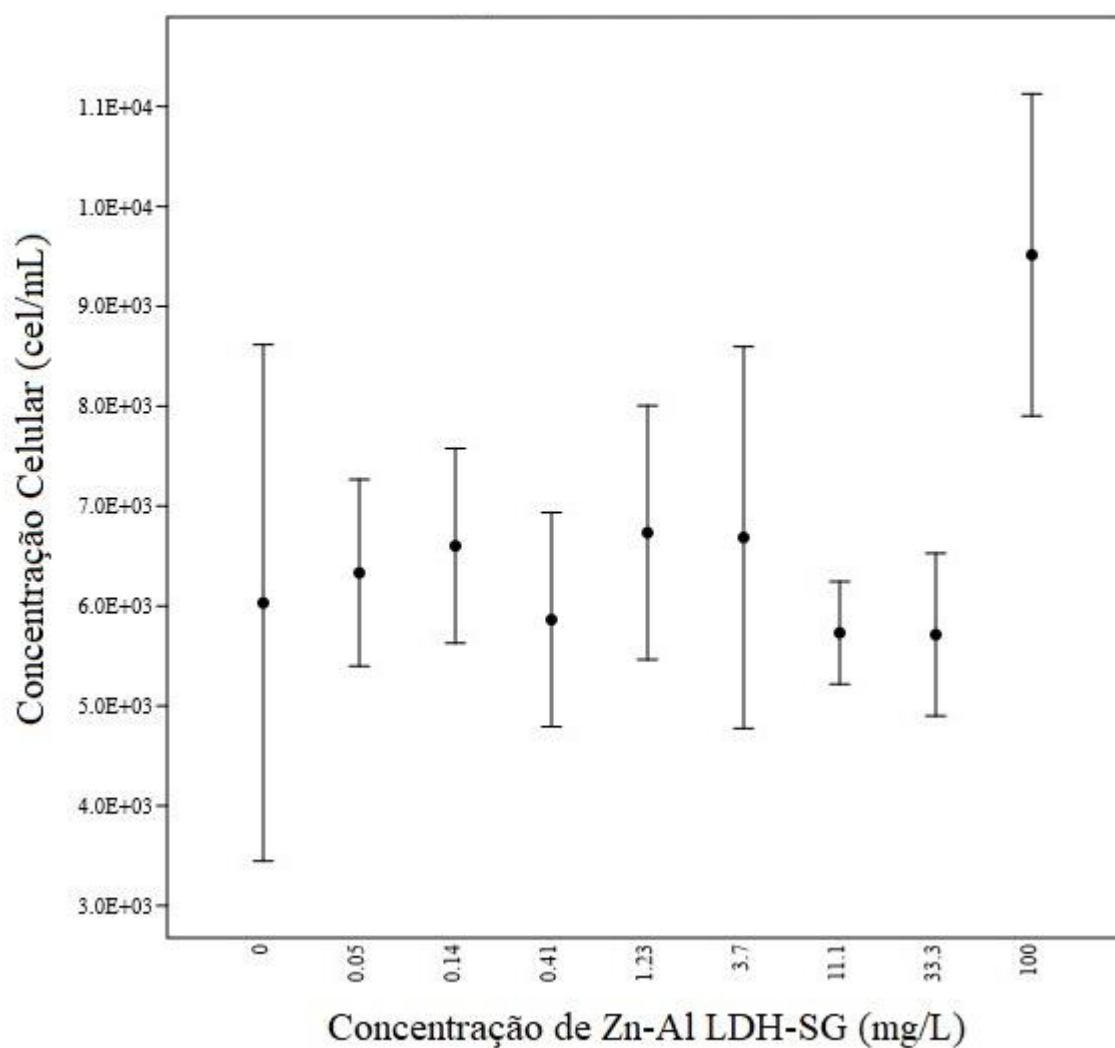


Figura 20. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-SG (mg/L) após 48h de exposição.

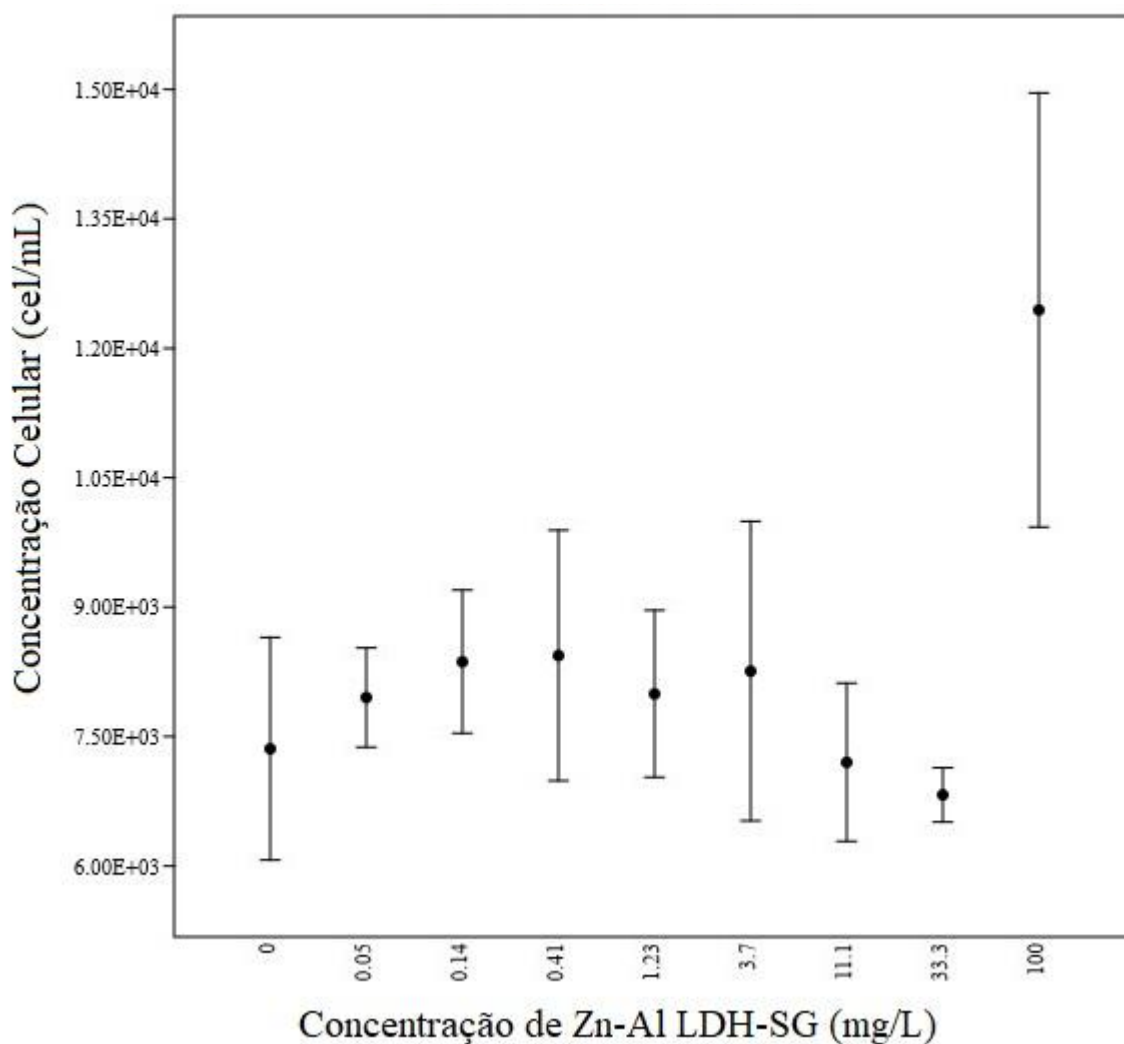


Figura 21. Concentração celular da microalga *Chlorella minutissima* (cel/mL) em função da concentração do composto Zn-Al LDH-SG (mg/L) após 72h de exposição.

5.2. CENO e CEO

O composto SG apresentou a CEO de 0,05 mg/L em todos os tempos testados, entretanto, não foi possível determinar o valor da CENO. O composto Zn-Al LDH-SG apresentou em 24h de exposição o valor da CEO também de 0,05 mg/L e não foi possível determinar a CENO. Contudo, em 72h de exposição, Zn-Al LDH-SG apresentou um valor de CEO de 100 mg/L e CENO 33,3 mg/L.

5.3. IC₅₀

Foi feita o cálculo no Python, para obtenção da IC₅₀ e intervalos de confiança (95%) para todos os compostos. Com isso, obtivemos o valor do IC₅₀ (mg/L) para cada composto nos diferentes tempos. De acordo com os dados apresentados na Tabela 1 foi notado que o composto MBT possui o menor valor de IC₅₀ para todos os períodos apresentados.

Tabela 1. Valores de IC₅₀ (mg/L) para cada composto e cada período. Sendo os valores com (**) o menor valor de IC₅₀ para aquele período e os valores com (-) sendo os valores acima de 100, valor da maior concentração testada, portanto valores desconsiderados. Entre os parênteses temos os valores do intervalo de confiança 95% para cada valor IC₅₀.

Compostos	Tempo (h)		
	24	48	72
MBT	2,06 (0,38 - 4,50)**	1,31 (0,50 - 3,12)**	1,35 (0,61 - 3,31)
Zn-Al LDH-MBT	4,75 (1,14-8,36)	8.90 (0,33-17,46)	11,97 (2,81-21,15)
Zn-Al LDH	26,77 (7,79-92,03)	5.37 (0,40-45,60)	1,22 (0,11-13,53)
Mg-Al LDH-MBT	18,03 (4,48-72,34)	2,11 (0,04-10,72)	0.18 (0.02-1.63)**
Mg-Al LDH	-	-	-
SG	-	-	-
Zn-Al LDH SG	-	-	-

O grau de toxicidade de cada composto é delimitado pelo valor de IC₅₀ e comparados com a diretiva EC (93/67/EEC) [66], sendo os valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Grau de toxicidade de substâncias de acordo com a Diretiva EC (93/67/EEC)

Adaptado de [67].

IC ₅₀ (mg/L)	Grau de Toxicidade
IC ₅₀ < 0,1	Extremamente Tóxico
IC ₅₀ 0,1 - 1	Muito Tóxico
IC ₅₀ 1 - 10	Tóxico
IC ₅₀ 10 - 100	Nocivo
IC ₅₀ > 100	Não Tóxico

Seguindo a diretiva e a tabela 2 podemos classificar os compostos da seguinte forma:

Tabela 3. Classificação da toxicidade dos compostos por tempo.

Compostos	Tempo (h)		
	24	48	72
MBT	Tóxico	Tóxico	Tóxico
Zn-Al LDH-MBT	Tóxico	Tóxico	Nocivo
Zn-Al LDH	Nocivo	Tóxico	Tóxico
Mg-Al LDH-MBT	Nocivo	Tóxico	Muito Tóxico
Mg-Al LDH	-	-	-
SG	-	-	-
Zn-Al LDH-SG	-	-	-

A partir dos valores de IC₅₀, foi comparada a toxicidade dos compostos. O IC MBT é o composto mais tóxico para a alga *C. minutissima*, possuindo os menores valores de IC₅₀ dentre os testes realizados nos períodos de 24 e 48 horas. Apenas no horário de 72 horas que o composto Mg-Al LDH MBT se destaca sendo Muito Tóxico. Em média, os compostos MBT e SG possuem uma alta toxicidade, se evidenciando como os compostos mais tóxicos. Os NME inovadores carregados com IC apresentaram uma menor toxicidade em relação ao IC MBT e SG puros.

6. Discussão

Compostos biocidas, como MBT e SG, já são usados amplamente como ICs pelo seu nível de toxicidade para espécies alvo da bioincrustação. Para diminuir esta toxicidade contra espécies não-alvo, continuar com suas propriedades inibitórias de corrosão e controlar sua dispersão pelo ambiente, estes compostos foram encapsulados por nanomateriais.

Microalgas marinhas, como *C. minutissima*, são ótimas bioindicadores pelo seu nível de sensibilidade, sendo as primeiras a serem afetadas por agentes tóxicos, por exemplo os biocidas testados. O que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, onde todos os compostos, que apresentaram valores de IC_{50} ou CENO e CEO, foram de nocivos a muito tóxicos para esta microalga.

Os estudos com estes compostos e microalgas marinhas são escassos, mas um estudo de Santos e colaboradores [68] em outras espécies como ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*; o composto MBT apresentou uma Concentração de Efeito a 50% dos indivíduos (CE_{50}) de 0,020 mg/L, enquanto suas versões nanoestruturadas Mg-Al LDH-MBT CE_{50} 0,055 mg/L, e Zn-Al LDH-MBT CE_{50} = 0,054 mg/L, ou seja menos tóxico para o organismo testado no estudo. As versões NME brutas Zn-Al LDH CE_{50} = 0,107 mg/L apresentou ser mais tóxico para este organismo-teste do que Mg-Al LDH CE_{50} = 0,368 mg/L. Diferente deste experimento onde o composto Mg-Al LDH-MBT se mostrou mais tóxico em 72h que sua versão pura. Em contrapartida em 72h o composto Zn-Al LDH-MBT, possui a menor toxicidade avaliada, podendo ser considerada um nanomaterial mais eficiente para encapsular o composto MBT.

Os LDHs puros apresentaram toxicidades diferentes, enquanto o Mg-Al LDH não apresentou um valor considerável de IC_{50} , Zn-Al LDH se apresentou como nocivo e foi aumentando sua toxicidade até níveis de tóxicos, o que é importante para se considerar, pois após a liberação do IC encapsulado os LDHs puros são dispersos na água. O estudo de Avelelas e colaboradores [26], demonstrou uma baixa toxicidade para duas microalgas marinhas, *Tetraselmis chuii* e *Phaeodactylum tricornutum*, onde o composto Zn-Al LDH apresentou um valor de IC_{50} > 100.000 μ g/L. Essas variações de resultados demonstram a necessidade de estudo em várias espécies para assim determinar qual biocida e NME são ideias para prevenir a CO e mortalidade de espécies não alvo.

Ao longo das 72 horas de experimento o composto Zn-AL LDH , se mostrou eficiente para encapsular o SG, visto que a versão nanoestruturada, Zn-AL LDH-SG, se mostrou

menos tóxica. Inclusive, demonstrando um aumento na concentração celular no último horário testado e em sua maior concentração, podendo ser ocasionado pela meia vida do composto ter sido atingida.

7. Conclusão

A toxicidade de dois biocidas IC (MBT e SG), dois NME brutos (Mg-Al LDH e Zn-Al LDH) e três NME inovadores carregados com IC (Zn-Al LDH-MBT, Mg-Al LDH-MBT, Zn-AL LDH-SG) foi avaliada utilizando a microalga marinha *Chlorella minutissima*. Todos os compostos avaliados apresentaram uma classificação entre nocivo e muito tóxico.

Os biocidas MBT e SG apresentaram maior toxicidade, sendo o MBT o mais tóxico, apresentando valores de IC₅₀ a 24h - 2,06 mg/L, 48h - 1,31 mg/L e 72h - 1,35 mg/L. O composto SG também possui uma alta toxicidade, mesmo não podendo serem definidos os valores de IC₅₀. através do CEO pode ser observada uma elevada mortalidade da microalga na menor concentração (0,05 mg/L) testada.

Os dados obtidos demonstram que, apesar de importantes para a indústria marítima, os ICs MBT e SG são tóxicos para esta espécie de microalga. As versões em nanoescala Zn-Al LDH-MBT, Mg-Al LDH-MBT e Zn-Al LDH-SG apresentaram, em média, uma menor toxicidade para *C. minutissima*, assim podendo ser uma alternativa menos tóxica para os IC reportados no presente estudo.

O composto Zn-Al LDH-SG desencadeou um aumento na concentração celular no horário de 72h e em sua maior concentração 100 mg/L.

São necessários mais estudos com outras microalgas e, também, outros organismos marinhos pertencentes a diferentes níveis tróficos para que possa efetivamente validar a utilização segura destes IC de nova geração.

8. Referências

- [1] Wang, J., Du, M., Li, G., Shi, P. (2022). Research progress on microbiological inhibition of corrosion: A review. *Journal of Cleaner Production*. 373:133658.
- [2] Procópio, L. (2020). The era of 'omics' technologies in the study of microbiologically influenced corrosion. *Biotechnology Letters*, 42:341-356.

- [3] Little, B. J., Blackwood, D. J., Hinks, J., Lauro, F. M., Marsili, E., Okamoto, A., Rice, S.A., Wade, S.A., Flemming, H. C. (2020). Microbially influenced corrosion-Any progress?. Cor. Sci.. 170:108641.
- [4] Jiang, L., Wang, C., Fu, H., Shen, J., Zhang, Z., Xie, J. (2022). Discovery of aluminum alloys with ultra-strength and high-toughness via a property-oriented design strategy. J. of Mat. Sci. & Tech.. 98:33-43.
- [5] Chen, S., Zheng, R., Zhang, S., Yuan, M., Guo, H., Meng, G., Zhang, P. (2023). Effect of marine microalgae *Synechococcus* sp., *Chlorella* sp., *Thalassiosira* sp. on corrosion behavior of Q235 carbon steel in F/2 medium. Bioelectrochem..150:108349.
- [6] Olivia, M., Moheimani, N., Javaherdashti, R., Nikraz, H. R., Borowitzka, M. A. (2013). The influence of micro algae on corrosion of steel in fly ash geopolymer concrete: a preliminary study. In Advan. Mat. Res. 626:861-866.
- [7] Nam, S. H., An, Y. J. (2021). Perspectives on microalgae as model organisms toward the standardization of soil algal toxicity test methods. Comp. Biochem. and Physio. Part C: Toxic. & Pharmacol.. 249:109144.
- [8] Dupraz V, Stachowski-Haberkorn S, Wicquart J, Tapie N, Budzinski H, Akcha F. (2019). Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system: toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. Chem. 221:278-291.
- [9] O'Neill, E. A., Rowan, N. J. (2022). Microalgae as a natural ecological bioindicator for the simple real-time monitoring of aquaculture wastewater quality including provision for assessing impact of extremes in climate variance-A comparative case study from the Republic of Ireland. Sci. of the Tot. Environ.802:149800.
- [10] Tapanes, N.D.L.C.O., dos Santos, A.A., de Carvalho Santana, A.I. da Silva, N.C., Gaidzinski, R., Perez, R.S. (2020). Anticorrosivo para uso de aço microligado em contacto com diesel de alto enxofre utilizado em embarcações marítimas. Braz. J. of Develop.6: 36929-36949.
- [12] Zhou, E., Zhang, M., Huang, Y., Li, H., Wang, J., Jiang, G., Jiang, C., Xu D., Wang Q., Wang, F. (2022). Accelerated biocorrosion of stainless steel in marine water via extracellular electron transfer encoding gene *phzH* of *Pseudomonas aeruginosa*. Water Res. 118634.
- [13] Dong, H. P., Wang, D. Z., Dai, M., Hong, H. S. (2010). Characterization of particulate organic matter in the water column of the South China Sea using a shotgun proteomic approach. Limno. and Oceano. 55:1565-1578.
- [14] Dou, W., Xu, D., Gu, T. (2021). Biocorrosion caused by microbial biofilms is ubiquitous around us. Micro. Biotech.. 14:803-805.

- [15] Arroussi, M., Bai, C., Zhao, J., Zhang, S., Xia, Z., Jia, Q., Yang, K. (2022). Preliminary study on biocorrosion inhibition effect of Ti-5Cu alloy against marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. App. Surf. Sci.. 578:151981.
- [16] Mieszkina, S., Callow, M. E., Callow, J. A. (2013). Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. Biofoul. 29: 1097-1113.
- [17] Dong, Y., Song, G. L., Zhang, J., Gao, Y., Wang, Z. M., Zheng, D. (2022). Biocorrosion induced by red-tide alga-bacterium symbiosis and the biofouling induced by dissolved iron for carbon steel in marine environment. J. of Mat. Sci. & Tech. 128:107-117.
- [18] Chen, S., Zheng, R., Zhang, S., Yuan, M., Guo, H., Meng, G., Zhang, P. (2022). Effect of marine microalgae *Synechococcus sp.*, *Chlorella sp.*, *Thalassiosira sp.* on corrosion behavior of Q235 carbon steel in f/2 medium. Bioelectrochem.108349.
- [19] Natarajan, L., Omer, S., Jetly, N., Jenifer, M. A., Chandrasekaran, N., Suraishkumar, G. K., Mukherjee, A. (2020). Eco-corona formation lessens the toxic effects of polystyrene nanoplastics towards marine microalgae *Chlorella sp.* Environ. Res. 188:109842.
- [20] Gosset, A., Durrieu, C., Barbe, P., Bazin, C., Bayard, R. (2019). Microalgal whole-cell biomarkers as sensitive tools for fast toxicity and pollution monitoring of urban wet weather discharges. Chemos.. 217:522-533.
- [21] Lozano, P., Trombini, C., Crespo, E., Blasco, J., Moreno-Garrido, I. (2014). ROI-scavenging enzyme activities as toxicity biomarkers in three species of marine microalgae exposed to model contaminants (copper, Irgarol and atrazine). Ecotoxicol. and Environ. Saf.104:294-301.
- [22] Delpy, F., Lucas, Y., Merdy, P. (2022). Evaluation of Roundup® effects on *Chlorella vulgaris* through spectral changes in photosynthetic pigments in fresh and marine water. Environ. Advan. 8:100240.
- [23] Ru, J. C., Zhao, X. L., Cao, Z. H., Chen, C. Z., Li, P., Li, Z. H. (2022). Chronic toxic effects of polystyrene micro-plastics, DCOIT and their combination on marine *Chlorella sp.* Comp. Biochem. and Physio. Part C: Toxicol. & Pharmacol. 261: 109426.
- [24] Roepke, L. K., Brefeld, D., Soltmann, U., Randall, C. J., Negri, A. P., Kunzmann, A. (2022). Antifouling coatings can reduce algal growth while preserving coral settlement. Sci Rep. 12:1-14.
- [25] Abi Nassif, L., Rioual, S., Trepos, R., Fauchon, M., Farah, W., Hellio, C., Lescop, B. (2019). Development of alginate hydrogels active against adhesion of microalgae. Mat. Lett. 239:180-183.

- [26] Avelelas, F., Martins, R., Oliveira, T., Maia, F., Malheiro, E., Soares, A. M., Suzana, L., Tedim, J. (2017). Efficacy and ecotoxicity of novel anti-fouling nanomaterials in target and non-target marine species. *Marin. Biotech.* 19:164-174.
- [27] Liao, C., Kim, U.-J., Kannan, K. (2018). A review of environmental occurrence, fate, exposure, and toxicity of benzothiazoles. *Environ. Sci. Technol.* 52:5007–5026.
- [28] Sorahan, T. (2009). Cancer risks in chemical production workers exposed to 2-mercaptobenzothiazole. *Occup. Environ. Med.* 66:69–273.
- [29] Wang, X.; Suskind, R.R. (1988). Comparative studies of the sensitization potential of morpholine, 2-mercaptobenzothiazole and 2 of their derivatives in guinea pigs. *Cont. Dermat.* 19:11–15.
- [30] U.S. Consumer Product Safety Commission (CPSC). (2006) Sensory and Pulmonary Irritation Studies of Carpet System Materials and Their Constituent Chemicals. Disponível em: <http://www.cpsc.gov/LIBRARY/FOIA/FOIA98/os/3519926D.pdf>.
- [31] Wan, Y.; Xue, J.; Kannan, K. (2016). Benzothiazoles in indoor air from Albany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure. *J. Hazard. Mater.* 311:37–42.
- [32] Wang, L.; Asimakopoulos, A.G.; Moon, H.B.; Nakata, H.; Kannan, K. (2013). Benzotriazole, benzothiazole, and benzophenone compounds in indoor dust from the United States and East Asian countries. *Environ. Sci. Technol.* 47:4752–4759.
- [33] Seeland, A.; Oetken, M.; Kiss, A.; Fries, E.; Oehlmann, J. (2012). Acute and chronic toxicity of benzotriazoles to aquatic organisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19:1781–1790.
- [34] Durjava, M.K.; Kolar, B.; Arnus, L.; Papa, E.; Kovarich, S.; Sahlin, U.; Peijnenburg, W. (2013). Experimental assessment of the environmental fate and effects of triazoles and benzotriazole. *Altern. Lab. Anim.* 41:65–75.
- [35] Wang, P.; He, B.; Du, Y.; Wang, B.; Gao, J.; Liu, S.; Ye, Q.; Zhou, F. (2022). Functionalized Ti₃C₂Tx-based nanocomposite coatings for anticorrosion and antifouling applications. *Chem. Engin. J.* 448:137668.
- [36] Zarebidaki, A.; Mofidi, S. H. H.; Bahri, F. I. (2022). Effect of 2-mercaptobenzothiazole on the corrosion inhibition of Cu–10Ni alloy in 3 wt% NaCl solution. *J. Appl. Electrochem.* 52:1773-1788.
- [37] Maia, F.; Silva, A. P.; Fernandes, S.; Cunha, A.; Almeida, A.; Tedim, J.; Zheludkevich M.L.; Ferreira, M. G. S. (2015). Incorporation of biocides in nanocapsules for protective coatings used in maritime applications. *Chem. Engin. J.* 270:150-157.
- [38] Ghorai, S.; Jalan, A. K.; Roy, M.; Das, A.; De, D. (2018). Tuning of accelerator and curing system in devulcanized green natural rubber compounds. *Poly. Test.* 69:133-145.

- [39] Krainara, S.; Suraraksa, B.; Prommeenat, P.; Thayanukul, P.; Luepromchai, E. (2020). Enrichment and characterization of bacterial consortia for degrading 2-mercaptobenzothiazole in rubber industrial wastewater. *J. Hazard. Mat.* 400:123291.
- [40] Wever, H. D.; Cort, S. D.; Noots, I.; Verachtert, H. (1997). Isolation and characterization of *Rhodococcus rhodochrous* for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiazole. *App. Microbio. Biotech.* 47:458-461.
- [41] Umamaheswari, B.; Rajaram, R. (2017). Microaerobic degradation of 2-Mercaptobenzothiazole present in industrial wastewater. *J. Hazardous Mat.* 321:773-781.
- [42] El-Bassi, L.; Iwasaki, H.; Oku, H.; Shinzato, N.; Matsui, T. (2010). Biotransformation of benzothiazole derivatives by the *Pseudomonas putida* strain HKT554. *Chemosphere.* 81: 109-113.
- [43] Chafki, L.; Rifi, E. H.; Touir, R.; Touhami, M. E.; Hatim, Z. (2018). Corrosion inhibition of mild steel in 1.0 M HCl solution by anhydrous tricalcium phosphate. *The Open Mat. Sci. J.*, 12(1):68-81.
- [44] Serdaroğlu, G.; Kaya, S.; Touir, R. (2020). Eco-friendly sodium gluconate and trisodium citrate inhibitors for low carbon steel in simulated cooling water system: Theoretical study and molecular dynamic simulations. *J. Mol. Liq.* 319, 114108.
- [45] Wang, Y.; Chen, Y.; Zhao, Y.; Zhao, D.; Zhong, Y.; Qi, F.; Liu, X. (2017). A reinforced organic-inorganic layer generated on surface of aluminium alloy by hybrid inhibitors. *J. Mol. Liqui.* 225:510-516.
- [46] Jennane, J.; Touhami, M. E.; Zehra, S.; Baymou, Y.; Kim, S. H.; Chung, I. M.; Lgaz, H. (2019). Influence of sodium gluconate and cetyltrimethylammonium bromide on the corrosion behavior of duplex (α - β) brass in sulfuric acid solution. *Mat. Chem. and Physi.*, 227:200-210.
- [47] Low, E. J.; Yusoff, H. M.; Batar, N.; Nor Azmi, I. N. Z.; Chia, P. W.; Lam, S. S.; Ridwan Zulkifli, M.F. (2023). The use of food additives as green and environmental-friendly anti-corrosion inhibitors for protection of metals and alloys: a review. *Environ. Sci. and Poll. Res.*, 30:1-11.
- [48] Li, J. H.; Zhao, B.; Hu, J.; Zhang, H.; Dong, S. G.; Du, R. G.; Lin, C. J. (2015). Corrosion inhibition effect of D-sodium gluconate on reinforcing steel in chloride-contaminated simulated concrete pore solution. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 10(1): 956-968.
- [49] Silva Neto, L. D. D. (2020). Síntese de hidróxido duplo lamelar: efeitos do processo de secagem. Tese de Mestrado. UFSCar.

- [50] Coronado, E.; Marti-Gastaldo, C.; Navarro-Moratalla, E.; Ribera, A. (2010). Confined growth of cyanide-based magnets in two dimensions. *Inorg. Chem.* 49:1313-1315.
- [51] Kameda, T.; Takeuchi, H.; Yoshioka, T. (2009) Hybrid inorganic/organic composites of Mg-Al layered double hydroxides intercalated with citrate, malate, and tartrate prepared by co-precipitation. *Mat. Res. Bull.* 44:840–845.
- [52] Kameda, T.; Uchiyama, T.; Yoshioka, T. (2016) Equilibrium and kinetics studies on the adsorption of substituted phenols by a Cu-Al layered double hydroxide intercalated with 1-naphthol-3,8-disulfonate. *J. of All. and Comp.*, 670:322–328.
- [53] Khan, A. I.; Lei, L.; Norquist, A. J.; O'Hare, D. (2001) Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide. *Chem. Com.* 21:2342– 2343.
- [54] Kooli, F.; Jones, W.; Rives, V.; Ulibarri, M.A. (1997) An alternative route to polyoxometalate-exchanged layered double hydroxides: the use of ultrasound. *J. of Mat. Sci. Let.* 16:27-29.
- [55] Labajos, F. M.; Rives, V.; Ulibarri, M. A.(1992) Effect of hydrothermal and thermal treatments on the physicochemical properties of Mg-Al hydrotalcite-like materials. *J. of Mat. Sci.* 27:1546–1552.
- [56] Leroux, F.; Taviot-Guého, C. (2005) Fine tuning between organic and inorganic host structure: New trends in layered double hydroxide hybrid assemblies. *J. of Mat. Chem.* 15:3628–3642.
- [57] Rives, V.; Del Arco, M.; Martín, C. (2014) Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *App. Clay Sci.* 88–89:239–269.
- [58] Roland-Swasson, C.; Besse, J. P.; Leroux, F. (2004) Polymerization of sulfopropyl methacrylate, a surface active monomer, within layered double hydroxide. *Chem. of Mat.* 16:5512–5517.
- [59] Vaysse, C.; Guerlou-Demourgues, L.; Duguet, E.; Delmas, C. (2003) Acrylate intercalation and in situ polymerization in iron-, cobalt-, or manganese-substituted nickel hydroxides. *Inorg. Chem.* 42:4559-4567.
- [60] Maia, F.; Yasakau, K. A.; Carneiro, J.; Kallip, S.; Tedim, J.; Henriques, T.; Ferreira, M. G. S. (2016). Corrosion protection of AA2024 by sol-gel coatings modified with MBT-loaded polyurea microcapsules. *Chem. Engin. J.* 283:1108-1117.
- [61] Guillard, R. R. L. (1975) Culture of Phytoplankton for feeding Marine Invertebrates. In: Smith, W.; Chanley, M. H. (Ed.). *Culture of Marine Invertebrates*. London, UK: Plenum Press. 29-60.

- [62]Guillard, R. R. L.; Ryther, John H. (1962) Studies of Marine Planktonic Diatoms: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canad. J. of Microbiology*. 8:229-239.
- [63] Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 12648:2018. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).
- [64] Dupraz V.; Stachowski-Haberkorn S.; Wicquart J.; Tapie N.; Budzinski H.; Akcha F. (2019) Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system: toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. *Chemosphere*. 221:278-291.
- [65] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2011), Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- [66] EEC Commission Directive (93/67/EEC) (1993) Laying Down the Principles for Assessment of Risks to Man and the Environment of Substances Notified in Accordance with Council Directive 67/548/EEC.
- [67] Bazin, I.; Gadal, A.; Touraud, E.; Roig, B. (2010) Hydroxy Benzoate Preservatives (parabens) in the Environment: Data for Environmental Toxicity Assessment. In: Fatta-Kassinos, D.; Bester, K.; Kummener, K. (Eds.), *Xenobiotics in Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*. *Environ. Poll.* 16: 245–257.
- [68] Santos, J.V.N.D.; (2023). Avaliação da ecotoxicidade crônica de 2-mercaptobenzotiazol livre e nanoestruturado em hidróxidos duplos lamelares. Tese de Mestrado. UNESP.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: DOUGLAS GOMES GONÇALVES

Título: "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE INIBIDORES DE CORROSÃO MARINHA DE BASE NANOTECNOLÓGICA SUSTENTÁVEL SOBRE *Chlorella minutissima*"

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	<i>Aprovado</i>
Dr. Caio Cesar Ribeiro	APROVADO
Bacharela Caterina do Valle Trotta	APROVADO

PARECER:

Aprovado com correções

Aprovado com correções

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que o discente **Douglas Gomes Gonçalves** obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 21 de junho de 2023.

Cristiane Angélica Ottoni

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Caio Cesar Ribeiro

Dr. Caio Cesar Ribeiro

Caterina

Bacharela Caterina do Valle Trotta