



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista



GENOTOXICIDADE DO 2-MERCAPTOBENZOTIAZOL (2-MBT) EM
SUAS FORMAS LIVRE E NANOESTRUTURADA SOBRE OS
BIVALVES *Ruditapes philippinarum* e *Anomalocardia flexuosa*

Maria Luiza Regueira Alves Lima

Denis Moledo de Souza Abessa

São Vicente
2024

MARIA LUIZA REGUEIRA ALVES LIMA

**GENOTOXICIDADE DO 2-MERCAPTOBENZOTIAZOL (2-MBT)
EM SUAS FORMAS LIVRE E NANOESTRUTURADA SOBRE OS
BIVALVES *Ruditapes philippinarum* e *Anomalocardia flexuosa***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas com ênfase em
Gerenciamento Costeiro na Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza
Abessa

São Vicente
2024

L732g Lima, Maria Luiza Regueira Alves

Genotoxicidade do 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) em suas formas livre e nanoestruturada sobre os bivalves *Ruditapes philippinarum* e *Anomalocardia flexuosa* / Maria Luiza Regueira Alves Lima. -- São Vicente, 2024

41 p. : tabs., fotos

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

Orientador: Denis Modelo de Souza Abessa

1. Genotoxicidade. 2. Anticorrosivos. 3. Nanomateriais. 4. Ensaio do cometa. 5. Bivalves. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Sou grata às agências de fomento que financiam os projetos de pesquisa maiores aos quais este TCC está associado (FAPESP, processo 2020/03004-0; CAPES-FCT, processo 88881.156405/2017-01; e FCT, processo CIRCNA/BRB/0291/2019); além, é claro, das minhas bolsas de iniciação científica e BEPE disponibilizadas pela FAPESP (#2022/14437- 0 e #2023/13199-1, respectivamente). Também agradeço por todo o conhecimento que eu adquiri nesses últimos anos graças as atividades relacionadas a esses projetos, as aulas ministradas pelo Prof. Dr. Roberto Martins em sua passagem pelo Brasil e as experiências com o Prof. Dr. Denis Abessa e seu laboratório NEPEA (Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática) que me fizeram descobrir novas oportunidades dentro da vida acadêmica.

Primeiramente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Denis Abessa pela oportunidade única de fazer parte de um projeto internacional, NANOGREEN, com a Universidade de Aveiro (UA) e por todo apoio, ensinamento, conselhos e conversas ao longo destes 3 anos de trabalho. Sua orientação, cuidado e acolhimento foram essenciais para que eu pudesse me encontrar como pesquisadora e hoje, inclusive, estou onde estou graças a esse grande professor que foi colocado no meu caminho e nunca vou deixar de ser grata por isso.

Obrigada a pessoas incríveis que conheci no laboratório e a toda ajuda que recebi delas, em especial à Thaisa, Guacira, Banban e Carol que além de terem me ensinado muito sempre foram excelentes companhias, tornando o ambiente mais leve e acolhedor, o que me motivou a desenvolver meu trabalho com mais graça. Sem dúvida todo conhecimento, experiência e competência que eu tenho hoje é graças a elas que mesmo em meio ao caos de seus próprios trabalhos sempre se mostraram disponíveis para mim, em todos os sentidos. Thaisa, muito obrigada por toda a parceria, companhia mesmo em dias desesperadores de trabalho, ensinamentos, conversas e apoio incondicional que você me proporcionou, você é uma pessoa e pesquisadora incrível e merece alcançar tudo que desejar na vida.

Gostaria de agradecer também à Universidade de Aveiro e as pessoas que conheci durante meus 3 meses de estágio e pesquisa por lá, em especial ao Prof. Roberto, Rita, Diogo, Joana e Carolina que dedicaram seu tempo para fazer com que minha agenda fosse cumprida em um curto espaço de tempo e foram essenciais para o desenvolvimento do meu projeto BEPE que compõe grande parte deste trabalho. Com eles aprendi novas técnicas, enfrentei novos desafios e o resultado de tudo isso é o trabalho que apresento abaixo.

Por fim, agradeço à minha família incluindo, é claro, meu cachorro Joca que trouxe muito mais brilho, amor e alegria aos meus dias em casa, e ao meu namorado Caio por terem me proporcionado os melhores e mais descontraídos momentos quando eu mais precisava de uma pausa. Em especial ao meu pai e minha mãe que nunca questionaram minhas escolhas e sempre estiveram ao meu lado, uma sorte que poucos tem.

Hoje, trabalho na área em que escolhi e, mesmo com pouco tempo de experiência, já vivenciei muito do que eu esperava e sonhava como bióloga e é só o começo. Dito isso, gostaria de agradecer, por fim, a Hydrobiology que me abriu espaço para concluir este trabalho e me forneceu todo apoio e suporte necessários enquanto minha vida mudava de cabeça para baixo 2 meses antes da conclusão e defesa deste TCC.

RESUMO

A corrosão metálica, um sério problema para a indústria marítima, é um fenômeno natural definido como a decomposição gradativa de estruturas metálicas. Por esse motivo, inibidores de corrosão (IC), isto é, aditivos químicos utilizados para retardar ou impedir o progresso deste fenômeno, são rotineiramente aplicados em tais estruturas. O 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) apresenta-se vantajoso para uso em estruturas expostas à corrosão atmosférica e aquática, devido ao seu baixo custo de produção e elevada performance. Porém, o descarte e liberação deste composto no ambiente marinho, podem causar toxicidade à biota aquática, o que cria a necessidade de desenvolvimento de IC ambientalmente amigáveis, com o objetivo de reduzir os impactos ambientais associados. Uma alternativa tecnológica consiste na imobilização do 2-MBT em nanomateriais manufaturados (NM), como os hidróxidos duplos lamelares (LDH), otimizando o uso do anticorrosivo por meio do mecanismo de liberação controlada. No entanto, o potencial genotóxico destes nanomateriais inovadores ainda não foi estudado a nível subcelular, uma das técnicas mais específicas para detectar danos no DNA em organismos é o ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE), conhecido como Ensaio do Cometa. Neste trabalho, esta técnica foi aplicada nos bivalves de região tropical, *Anomalocardia flexuosa*, e temperada, *Ruditapes philippinarum*, visando avaliar e comparar a genotoxicidade do nanomaterial anticorrosivo (LDH-MBT), de sua forma livre (2-MBT) e do nanomaterial vazio de nitrito (LDH-NO₂) e nitrato (LDH-NO₃) sobre esses organismos. As soluções-teste foram preparadas em três concentrações: 1,23; 11,11 e 100 mg/L contendo cinco réplicas cada e mais cinco réplicas do controle, totalizando 65 organismos ao todo (um animal por réplica). Os resultados obtidos indicaram maior genotoxicidade para o MBT livre, com a maior média de dano no DNA chegando a 97,4% na espécie tropical, e 82,2% na espécie temperada, o que corrobora com a primeira hipótese de que o nanomaterial LDH seria eficaz no controle da liberação do anticorrosivo tóxico 2-MBT, deixando-o menos tóxico para ambas as espécies de bivalve. Quanto ao nanomaterial vazio, o LDH nitrito foi menos tóxico do que o LDH-MBT, uma vez que demonstrou na maior concentração 39,7% de dano no DNA para espécie temperada e 72,3% na espécie tropical comparado a 76,2% e 84,3%, respectivamente, de dano causado pelo LDH-MBT, o que o torna um IC potencialmente mais ambientalmente amigável.

Palavras-chave: genotoxicidade, bivalves, anticorrosivos, nanomateriais, ensaio do cometa.

ABSTRACT

One of the most challenging problems for the marine industry is corrosion, a natural phenomenon defined as the gradual decomposition of metallic structures. Corrosion inhibitors (CIs), that is, chemical additives used to delay or prevent the progress of this phenomenon, are commonly applied to such structures. The 2-mercaptobenzothiazole (2-MBT) is a CI used in structures exposed to atmospheric and aquatic corrosion, due to its low production cost and high performance. However, the disposal and release of this compound into the marine environment can cause toxicity to aquatic biota, leading to the need of developing ecofriendly CIs to reduce the associated environmental impacts. A technological alternative consists of immobilizing 2-MBT in manufactured nanomaterials (NM), such as lamellar double hydroxides (LDH), optimizing the use of the anticorrosive through a controlled release mechanism. However, the genotoxic potential of these innovative nanomaterials has not yet been studied at the subcellular level. One of the most specific techniques for detecting DNA damage in organisms is the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, known as the Comet Assay. In this study, this technique was applied to tropical and temperate bivalves *Anomalocardia flexuosa* and *Ruditapes philippinarum*, respectively, aiming to assess the genotoxicity of the anticorrosive nanomaterial (LDH-MBT), its free form (2-MBT) and the empty nitrite nanomaterial (LDH-NO₂) and nitrate (LDH-NO₃) on these organisms. Test solutions were prepared in three concentrations: 1.23, 11.11 and 100 mg/L with five replicates each and five more replicates for the control, meaning 65 organisms in total (one animal per replicate). The results indicated greater genotoxicity for free MBT, with the highest DNA damage average reaching 97.4% in the tropical species, and 82.2% in the temperate species, which corroborates the first hypothesis that the LDH nanomaterial would be effective in controlling the release of the toxic anticorrosive 2-MBT, making it less toxic for both species of bivalve. As for the empty nanomaterial, LDH nitrite was less toxic than LDH-MBT, as it demonstrated 39.7% DNA damage in the highest concentration for temperate species and 72.3% in tropical species compared to 76.2% and 84.3%, respectively, of damage caused by LDH-MBT, which makes it a potentially more environmentally friendly CI.

Key words: genotoxicity, bivalves, anticorrosives, nanomaterials, comet assay.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1 Corrosão	9
1.2 Inibidores de Corrosão (IC) e Nanomateriais Manufaturados (NM)	10
1.3 Genotoxicidade	12
1.4 Organismos-teste	14
3.1 Teste de exposição	16
3.2 Efeitos agudos	17
3.3 Ensaio do cometa com as células dos bivalves	17
3.3.1 Suspensão das células, preparação das lâminas, lise e electroforese.....	17
3.3.2 Leitura e preservação das lâminas.....	17
3.4 Cálculo da porcentagem de dano no DNA.....	18
3.5 Análise estatística.....	19
4.1 Sobrevivência.....	19
4.2 Resultados para <i>Ruditapes philippinarum</i>	20
4.3 Resultados para <i>Anomalocardia flexuosa</i>	22
5.1 <i>Ruditapes philippinarum</i>	24
5.2 <i>Anomalocardia flexuosa</i>	26
ANEXO I	34
ANEXO II	34
ANEXO III	36
ANEXO IV	39
ANEXO V	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) (Liao <i>et al.</i> , 2018).....	8
Figura 2- Estrutura e composição iônica do LDH (hidróxido duplo-lamelar) (Adaptado de Paredes <i>et al.</i> , 2011).....	9
Figura 3- Representação do mecanismo de auto-cura dos LDHs – (A) processo de corrosão; (B) restauração do revestimento; (C) arranhão fechado por aquecimento da barreira protetora; (D) liberação do MBT e sua troca com os íons de cloreto, formando uma camada protetora no substrato metálico; (E) mecanismo de reconstituição tardia somada a ação do MBT (Lutz <i>et al.</i> , 2016).....	10
Figura 4- <i>Anomalocardia flexuosa</i> (Linnaeus, 1767)(Arquivo pessoal).....	12
Figura 5- Amêijoia <i>Ruditapes philippinarum</i> (Adams e Reeve, 1850) (Fotógrafo Terry Wimbleton para The Marine Life Information Network).....	13
Figura 6- Núcleo das células de <i>Ruditapes philippinarum</i> , respectivamente na escala de 0 a 4. Na ordem da esquerda para a direita - tipo 0: sem danos; tipos 1 e 2: danos leves a moderados; tipos 3 e 4: danos extensos ao DNA.....	17
Figura 7- Porcentagem de danos ao DNA em células de <i>Ruditapes philippinarum</i> expostas a concentrações crescentes dos compostos LDH-NO ₂ (a); LDH-NO ₃ (b); LDH-MBT (c) e MBT livre (d). Valores de significância (p < 0,05). Os dados são apresentados como valores médios percentuais ± desvio padrão.....	20
Figura 8- Porcentagem de danos ao DNA em células de <i>Anomalocardia flexuosa</i> expostas a concentrações crescentes dos compostos LDH-NO ₂ (a); LDH-NO ₃ (b); LDH-MBT (c) e MBT livre (d). Valores de significância (p < 0,05). Os dados são apresentados como valores médios percentuais ± desvio padrão.....	21
Figura 9- Gráficos comparativos para a média de dano no DNA para as espécies <i>R. philippinarum</i> (cinza claro) e <i>A. flexuosa</i> (cinza escuro) para cada composto: LDH-NO ₂ (a); LDH-NO ₃ (b) e MBT livre (c), e LDH-MBT (d).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados de sobrevivência (S) em porcentagem para <i>R. philippinarum</i> em cada concentração após a exposição aos quatro compostos, considerando que foram feitas 5 réplicas por concentração.....	18
--	----

1. Introdução

1.1 Corrosão

A corrosão, um dos problemas mais desafiadores para a indústria marítima, é um fenômeno natural definido como a decomposição gradativa de metais e outros materiais, sendo provocada por reações químicas e/ou eletroquímicas deste material com o ambiente em que está inserido (Kelly *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2017). Em ambientes marinhos, estruturas metálicas estão constantemente expostas a um meio agressivo, no qual estão sujeitas à corrosão atmosférica e aquosa (Kurth *et al.*, 2019). Isso ocorre devido a fatores ambientais como o pH, temperatura, umidade, além da presença de gases, sais e espécies de eletrólitos na superfície do metal (Raja *et al.*, 2016).

A navegação comercial e a indústria petrolífera estão entre as atividades econômicas mais prejudicadas pela corrosão, já que navios, plataformas de petróleo e tubulações estão entre as estruturas mais afetadas pela corrosão. Para evitar as perdas de materiais de elevado uso industrial, investimentos têm sido feitos para o desenvolvimento de tecnologias anticorrosivas, as quais incluem revestimentos, técnicas de modificação do meio, proteção catódica e anódica, e adição de inibidores químicos de corrosão, como alguns compostos orgânicos (Frauches-Santos *et al.*, 2013). Tintas com propriedades anticorrosivas e anti-incrustantes feitas à base de compostos tóxicos têm sido historicamente utilizadas para proteger cascos de navios, porém a exposição às partículas liberadas a partir das superfícies pintadas representa um risco às espécies marinhas, direta ou indiretamente (Muller-Karanassos *et al.*, 2021; Uc-Peraza *et al.*, 2022).

Tradicionalmente as estruturas metálicas eram protegidas pelo uso de cromatos como inibidores de corrosão que, apesar de relativamente eficientes, foram considerados extremamente tóxicos ao meio e cancerígenos aos trabalhadores envolvidos no processo de produção (Morais *et al.*, 2018). Com isso, houve a necessidade de se desenvolver alternativas menos nocivas ao ambiente e à saúde humana. Assim, foram desenvolvidos inibidores corrosivos orgânicos naturais ou sintéticos, que, em sua maioria, agem por adsorção à interface metal-solução (Cardoso *et al.*, 2005). Devido à sua alta capacidade de proteção e praticidade nos processos de síntese e aplicação, os inibidores de corrosão e composição orgânica são os mais utilizados atualmente, com destaque para o uso de fosfatos, vanadatos e compostos do grupo benzotiazol, sobretudo o 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) (Goyal *et al.*, 2018).

1.2 Inibidores de Corrosão (IC) e Nanomateriais Manufaturados (NM)

A corrosão de estruturas metálicas é um dos principais problemas atuais na indústria naval. Nesse sentido, a utilização de revestimentos anticorrosivos especializados, contendo compostos ativos como inibidores de corrosão (Martins *et al.*, 2017), consiste em uma estratégia principal para evitar ou pelo menos minimizar a corrosão metálica. O 2-mercaptobenzotiazol ($C_7H_5NS_2$) (**Figura 1**), ou 2-MBT, é um composto organossulfurado aromático heterocíclico considerado extremamente tóxico, mas devido à sua eficácia no combate à corrosão, tem sido amplamente utilizado nesses revestimentos. Como consequência, o MBT acaba sendo liberado em ecossistemas aquáticos e causa efeitos tóxicos em espécies marinhas (Ohsawa & Suëtaka, 1979; Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2020).

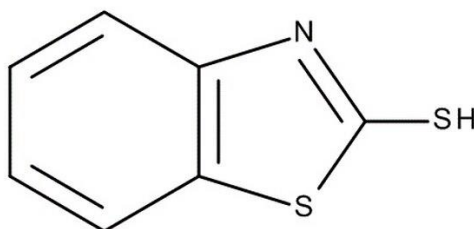


Figura 1- Estrutura química do 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) (Adaptado de Liao *et al.*, 2018).

Devido à crescente aplicação de restrições ao uso de substâncias tóxicas na legislação ambiental e à forte concorrência global, a indústria naval tem exigido uma maior eficiência e vida útil das atuais formulações de tintas, assim como menor toxicidade e persistência, levando ao desenvolvimento de abordagens nanotecnológicas alternativas (Almeida, *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2012; Rahimi & Amiri, 2016). Estas novas abordagens incluem a imobilização de ingredientes ativos, como o 2-MBT, em nanomateriais estruturados. Esta estratégia permite evitar a interação direta dos compostos ativos com as formulações de tintas, proporcionando uma barreira de proteção entre o inibidor de corrosão e o meio ambiente. Esse processo promove sua liberação controlada em condições específicas, como degradação do revestimento, alterações de pH e presença de cloretos em ambientes corrosivos (Martins *et al.*, 2017; Tedim *et al.*, 2012).

Nesse sentido, nanomateriais manufaturados (NM) consistem em partículas naturais ou artificiais com tamanho menor que 100 nm; estes NM são usados para o

encapsulamento de compostos ativos (como os bio-IC), e representam uma inovação tecnológica promissora, que visa promover a otimização de seu uso e reduzir os impactos ambientais (Peralta-Videa *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2012; Rahimi & Amiri, 2016; Martins *et al.*, 2017), uma vez que o encapsulamento gera uma liberação controlada das substâncias. Um exemplo de nanomaterial são os hidróxidos duplos lamelares (LDH) que possuem resultados viáveis quanto ao encapsulamento de agentes anticorrosivos (Tedim *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2012; Serdechnova *et al.*, 2017).

Esses nanomateriais (NM) incluem nanopartículas inorgânicas, cápsulas poliméricas e argilas de troca iônica, e são conhecidos por serem “inteligentes” por terem uma combinação de eventos autocurativos que desencadeiam a liberação de compostos ativos enquanto constroem uma barreira que previne seus efeitos tóxicos ao meio ambiente (Choi & Choy, 2011). Neste trabalho, um hidróxido duplo lamelar (LDH) foi utilizado como nanoargila aniônica para imobilizar o anticorrosivo 2-MBT. Sua estrutura consiste em pilhas de hidróxidos de metais mistos carregados positivamente, contendo cátions metálicos divalentes (por exemplo, Zn^{2+}) e trivalentes (por exemplo, Al^{3+}) e estabilizados por ânions (por exemplo, nitritos e nitratos, como é o caso dos utilizados no presente estudo, LDH- NO_2 e LDH- NO_3) localizados entre as camadas carregadas positivamente (Tedim *et al.*, 2011) (**Figura 2**).

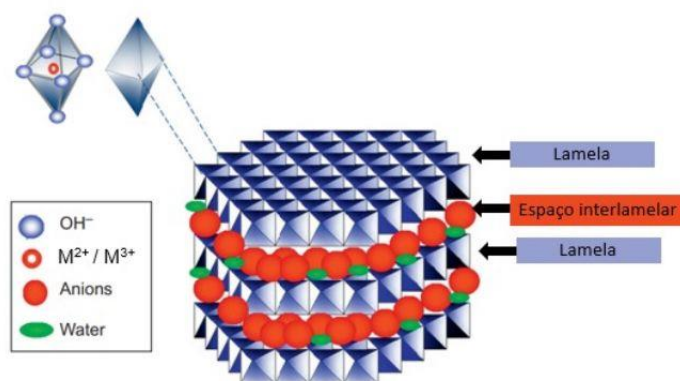


Figura 2- Estrutura e composição iônica do LDH (hidróxido duplo-lamelar) (Adaptado de Paredes *et al.*, 2011).

Esses nanomateriais manufacturados (NM) possuem características físico-químicas excepcionais, como a boa biocompatibilidade; alta estabilidade química devido a intercalação de camadas com cargas positivas e negativas; alta relação com superfície-volume e alta capacidade de adsorção (Arrabito *et al.*, 2019; Carneiro *et al.*, 2023). O principal papel dos LDHs é o armazenamento e liberação dos ICs sob demanda, como

resultado da troca aniônica entre espécies inibidoras e ânions cloreto da solução eletrolítica. No entanto, paralelamente à liberação do inibidor, uma quantidade equivalente de cloretos é adsorvida pelo nanomaterial. Além disso, quando as nanocápsulas estão carregadas com os inibidores de corrosão, podem desempenhar uma função dupla capturando ânions agressivos no revestimento e liberando inibidor de corrosão quando a agressividade do ambiente é alta (Tedim *et al.*, 2012)(Figura 3).

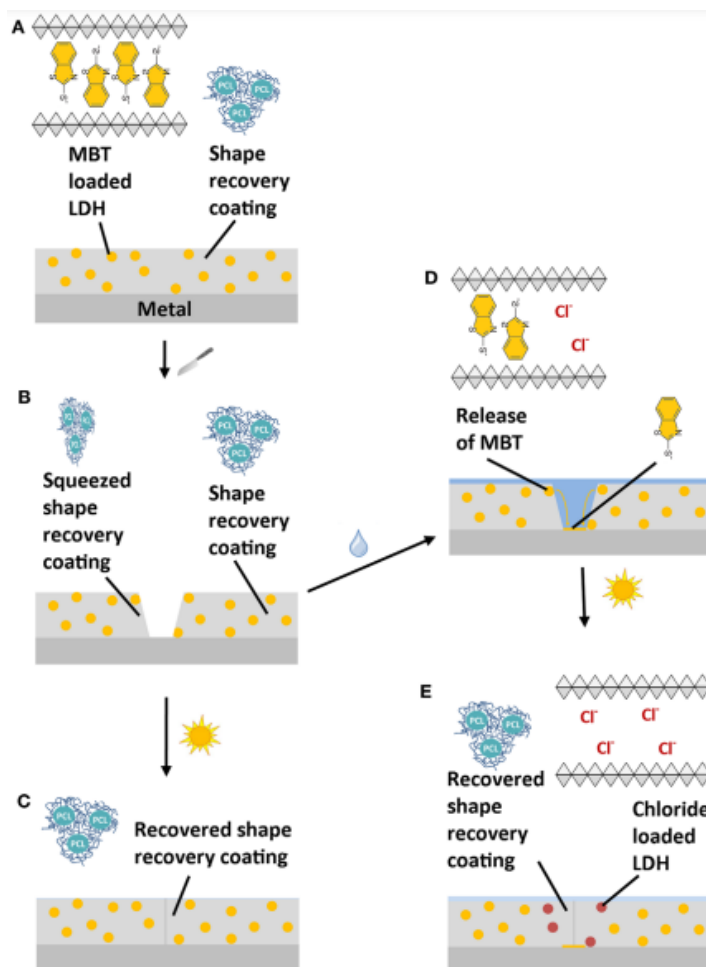


Figura 3- Representação do mecanismo de auto-cura dos LDHs – (A) processo de corrosão; (B) restauração do revestimento; (C) arranhão fechado por aquecimento da barreira protetora; (D) liberação do MBT e sua troca com os íons de cloreto, formando uma camada protetora no substrato metálico; (E) mecanismo de reconstituição tardia somada a ação do MBT (Lutz *et al.*, 2016).

1.3 Genotoxicidade

A entrada de contaminantes químicos de origem antropogênica nos corpos d'água tem o potencial de afetar a saúde do ecossistema aquático. A exposição a tais substâncias pode afetar a saúde e a sobrevivência de organismos aquáticos através de diversos mecanismos, que podem provocar alterações no crescimento, reprodução e

sobrevivência dos organismos, mas também podem causar efeitos mais sutis, envolvendo alterações fisiológicas, celulares, bioquímicas ou moleculares, o que dificilmente consegue ser medido e analisado em testes de toxicidade tradicionais (Hook *et al.*, 2014). Tais efeitos podem incluir danos do material genético dos organismos levando à genotoxicidade (danos estruturais nos cromossomos e genes) e mutagenicidade (ocorrência de mutações deletérias) (Maurici *et al.*, 2006).

Por sua vez, a maioria dos contaminantes ambientais podem, direta ou indiretamente, danificar o DNA dos organismos expostos, como visto por Çavaş & Ergene-Gözükara (2005) em peixes de locais poluídos. Organismos expostos a substâncias potencialmente genotóxicas ou mutagênicas frequentemente apresentam uma grande quantidade de anormalidades e danos em seu DNA celular (Seriani *et al.*, 2013). Para estudar tais efeitos, a utilização de técnicas capazes de detectar danos ao DNA das células, individualmente, consiste em uma alternativa eficaz (Singh *et al.*, 1988).

No nível subcelular, o dano ao DNA tem sido utilizado como indicador de genotoxicidade, que é uma das categorias de classificação química na avaliação de risco. Uma das técnicas mais específicas para detectar danos no DNA em organismos é o ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE), conhecido como ensaio do cometa. Esta abordagem foi desenvolvida por Ostling e Johanson (1984), baseada nos princípios da microeletroforese para observar danos no DNA em células individuais. A técnica foi posteriormente modificada em condições alcalinas por Singh *et al.* (1988) e depois testado e validado por Collins (2004).

O ensaio cometa é um método barato, rápido e eficaz para identificar genotoxicidade (Tice *et al.*, 2000; de Lapuente *et al.*, 2015), e pode detectar danos de DNA de fita simples e dupla (Augustyniak, Gladysz, & Dziwiecka, 2016). As quebras na cadeia de DNA são um tipo de lesão considerada um dos piores danos que podem ser causados em nível subcelular, uma vez que podem ser transpostas para o nível populacional através da hereditariedade (Jha, 2008), ou causar perda das funções celulares. Estas lesões podem ser detectadas pela técnica do ensaio cometa, fornecendo informações cruciais para avaliações de perigos e riscos (Shugart & Theodorakis, 1998).

O método do ensaio cometa tem sido utilizado não apenas em células humanas e de outros mamíferos (OCDE, 2014), mas também em diferentes tipos de organismos, como bactérias (Solanky e Haydel, 2012), plantas (Santos *et al.*, 2015; Ventura *et al.*, 2015; *al.*, 2013), fungos (Azevedo *et al.*, 2011; Hahn e Hock, 1999) e invertebrados

aquáticos (Silva *et al.*, 2015; Pavlaki *et al.*, 2016) e terrestres (Gaivão & Sierra, 2014; Reinecke, 2004; Salagovic *et al.*, 1995; Frenzilli, Nigro & Lyons (2009) apresentaram uma revisão na qual vários estudos demonstraram como o ensaio cometa pode ser aplicado a uma ampla variedade de invertebrados filtradores, como mexilhões, ostras e amêijoas, fornecendo uma avaliação sensível, rápida e versátil das condições ambientais. genotoxicidade.

1.4 Organismos-teste

No presente estudo, os bivalves *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus 1767) e *Ruditapes philipinarum* (Adams e Reeve, 1850) foram utilizados para avaliar a genotoxicidade de um nanomaterial anticorrosivo (LDH-MBT) e seus equivalentes livres (2-MBT), e dos nanomateriais brutos (LDH-NO₂, LDH-NO₃) usados para imobilizar o MBT. O bivalve *Anomalocardia flexuosa* (**Figura 4**) é uma espécie típica tropical e subtropical, ocorrendo no Atlântico desde a América Central até o Uruguai, é consumido e comercializado pelas comunidades tradicionais costeiras e a sua exploração depende exclusivamente dos estoques naturais.



Figura 4: *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus, 1767) (Arquivo pessoal).

Já o bivalve *Ruditapes philipinarum* (**Figura 5**) é nativo da região Indo-Pacífico e foi introduzido na Europa na década de 1970 para fins comerciais. Estas amêijoas comestíveis são organismos bentônicos filtradores que se alimentam de sedimentos e material particulado em ressuspensão, o que os torna extremamente vulneráveis a compostos tóxicos acumulados na interface água e substrato. Devido ao fato de serem apreciados para consumo humano, sua saúde é uma questão que preocupa a indústria alimentar devido aos poluentes dispersos no ambiente marinho, particularmente nos

organismos utilizados para consumo humano (Delgado e Pérez-Camacho, 2007; Santana *et al.*, 2017). Não surpreendentemente, *R. philippinarum* tem sido utilizado em uma ampla gama de estudos ecotoxicológicos como modelo biológico (Chong & Wang, 2000; Fan & Wang, 2001; Martins *et al.*, 2017).



Figura 5- Amêijoia *Ruditapes philippinarum* (Adams e Reeve, 1850) (Fotógrafo Terry Wimbleton para The Marine Life Information Network).

2. Objetivos

O presente trabalho visou avaliar e comparar os efeitos agudos subcelulares, em particular a genotoxicidade de um nanomaterial anticorrosivo (LDH-MBT) e sua forma livre (2-MBT) e do nanomaterial vazio associado ao nitrito (LDH-NO₂) e ao nitrato (LDH-NO₃) nos bivalves *Anomalocardia flexuosa* e *Ruditapes philippinarum*.

A primeira hipótese é que o MBT, em sua forma livre, cause elevados efeitos subcelulares nos bivalves, enquanto sua forma imobilizada pelo nanomaterial (LDH-MBT) seja menos genotóxica em ambas as espécies de bivalves. Já a segunda hipótese sugere que o nanomaterial vazio composto por nitrito (LDH-NO₂), devido ao potencial de agir como inibidor de corrosão, seja uma alternativa menos genotóxica do que o nanomaterial anticorrosivo LDH-MBT.

Nesse contexto, este projeto está associado a uma cooperação internacional envolvendo a Universidade de Aveiro e a empresa Smallmatek Ltda., a qual visa desenvolver novos inibidores de corrosão mais eficientes e menos tóxicos, usando a nanoengenharia. Assim, os dados obtidos deverão ajudar a determinar os riscos ambientais destes nanomateriais inovadores, antes de seu lançamento no mercado.

3. Materiais e métodos

O presente estudo aplicou o ensaio cometa em moluscos bivalves (*R. philippinarum* e *A. flexuosa*) para medir efeitos genotóxicos. A metodologia foi adaptada de protocolos publicados anteriormente do ensaio cometa em outros organismos, como copépodes e camarões (Pavlaki *et al.*, 2016) e colêmbolos (Cardoso *et al.*, 2017), porém no caso dos bivalves *R. philippinarum* e *A. flexuosa* foram utilizados hemócitos obtidos a partir da hemolinfa.

3.1 Teste de exposição

A amêijoia marinha *Ruditapes philippinarum* foi adquirida numa instalação de aquicultura na lagoa costeira da Ria de Aveiro (norte de Portugal). Os organismos foram aclimatados por 72 h em grupos de 12 indivíduos mantidos em aquários com água do mar reconstituída (salinidade = 35) a $19\pm1^{\circ}\text{C}$, com aeração contínua, e foram alimentados uma vez (2×10^6 células de microalgas em 1 mL por aquário) 24 horas antes do início da exposição (T0) (Figueiredo *et al.*, 2019). Após a aclimação, os organismos foram selecionados aleatoriamente e expostos individualmente em recipientes de vidro de 150 mL, por 96 horas, com aeração contínua e, desta vez, sem alimento. Os testes de exposição incluíram três concentrações (1,23, 11,11 e 100 mg/L) do inibidor anticorrosivo (MBT), dos nanomateriais descarregados (LDH-NO₂; LDH-NO₃) e do LDH carregado com MBT (LDH-MBT), cinco réplicas por tratamento (n=5, 1 animal por réplica), incluindo controle negativo (água do mar reconstituída não contaminada), totalizando 65 animais. Após o teste de exposição, a água contaminada e os resíduos químicos foram armazenados adequadamente em bombonas etiquetadas para tratamento antes do descarte seguro.

A respeito dos experimentos realizados no Brasil com a espécie tropical *Anomalocardia flexuosa*, os animais foram adquiridos junto a pescadores do litoral sul do Estado de São Paulo, tendo sido coletados na região de Cananéia. Estes animais passaram pelo mesmo teste de exposição descrito para a espécie temperada, mas cabe a observação de que os organismos foram aclimatados, também, por 72 h, porém em apenas 2 aquários contendo aproximadamente 40 indivíduos cada, em temperatura de $24\pm1^{\circ}\text{C}$, água do mar reconstituída com salinidade 20 e fotoperíodo de 12h:12h (claro/escuro).

3.2 Efeitos agudos

Inicialmente, a exposição das amêijoas teve como objetivo medir os efeitos genotóxicos através do ensaio cometa, mas depois avaliou-se também a letalidade nos indivíduos dos diferentes tratamentos no decorrer da exposição, uma vez que a mortalidade foi superior ao esperado, comparando com o que foi observado para a mesma espécie com os mesmos protocolos de exposição em Martins *et al.* (2017), que será discutido posteriormente na seção 4.1 “Sobrevivência”.

3.3 Ensaio do cometa com as células dos bivalves

3.3.1 Suspensão das células, preparação das lâminas, lise e electroforese

Ao final da exposição, em ambos os ensaios (espécie tropical e temperada), os animais vivos foram imediatamente sacrificados e sua hemolinfa foi extraída de cada um deles (i.e., cada organismo constituiu uma réplica) e colocada em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH = 7,4). Os microtubos foram deixados em gelo por 30 minutos e depois centrifugados (200 g) por 20 minutos a 4°C.

Após centrifugação, foram removidos aproximadamente 300 µL do sobrenadante. A fração celular obtida no sedimento foi então agitada suavemente e 30 µL foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo 125 µL de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão a 37°C. Esta suspensão foi misturada duas vezes e a mistura foi espalhada nas lâminas de vidro que foram colocadas sobre o gelo por 10 min para que a agarose chegasse na consistência ideal e as lamínulas pudessem, então, ser cuidadosamente removidas por deslizamento.

Para liberação do material genético das células, as lâminas foram colocadas em solução de lise (Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2,5 M, DMSO 10%, Triton X-100 a 10% e pH 10 ajustado com NaOH) por pelo menos 1h. Para o processo de eletroforese, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese preenchida com solução 10 M de NaOH, Na₂EDTA (a 4°C) e ali deixadas por 20 min, permitindo a desnaturação e desenrolamento do DNA. Em seguida, uma corrente elétrica de 300 mA (30V) foi usada por mais 20 min no escuro para evitar danos ao DNA induzidos pelo ultravioleta.

3.3.2 Leitura e preservação das lâminas

Após o processo de eletroforese, as lâminas precisaram ser neutralizadas em 3 etapas de lavagem com Tris-HCl 0,4 M (pH ~7,5). A primeira lavagem consistiu em um

banho rápido de solução nas lâminas, enquanto na segunda e terceira lavagens a solução de Tris-HCl foi deixada por 5 min no topo das lâminas. Só então as lâminas passaram pela etapa final de imersão em etanol absoluto por 10 segundos, e por fim, deixadas a secar no escuro por pelo menos 1 dia até a observação dos cometas.

No ensaio realizado na Universidade de Aveiro com *R. philippinarum*, as lâminas foram observadas sob um microscópio de fluorescência (microscopia fluorescente Carl Zeiss Axio Scope A1) usando um aumento de 400x. Antes da visualização, as lâminas foram coradas com 80 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Já no ensaio realizado na UNESP IB-CLP com *A. flexuosa*, as lâminas foram levadas ao IEAMar (Instituto de Estudos Ambientais Marinhos), coradas com 60 µL de Brometo de Etídio e observados sob um microscópio de fluorescência (LEICA DMI3000) usando o maior aumento disponível de 64x. As imagens foram capturadas e, posteriormente, os danos no DNA foram contados e pontuados de acordo com o nível de dano do DNA utilizando uma escala de 0 a 4, conforme relatado por Duthie & Collins (1997).

3.4 Cálculo da porcentagem de dano no DNA

A pontuação total do cometa é a porcentagem de danos calculada a partir de cada uma das três concentrações dos quatro contaminantes testados. Foi determinado de acordo com o método de Duthie e Collins (1997) e expresso pela seguinte equação escrita por Pavlaki *et al.* (2016) e Cardoso *et al.* (2017):

$$\begin{aligned} \text{Pontuação total cometa} &= (\text{número de células [tipo 0]} \times 0) \\ &+ (\text{número de células [tipo 1]} \times 1) \\ &+ \text{número de células [tipo 2]} \times 2) \\ &+ (\text{número de células [tipo 3]} \times 3) \\ &+ (\text{número de células [tipo 4]} \times 4) \end{aligned}$$

De acordo com Duthie e Collins (1997), os danos no DNA podem ser pontuados visualmente usando uma escala de 0 a 4, onde os cometas do tipo 0 representam nenhum dano ao DNA; os cometas dos tipos 1 e 2 apresentam, respectivamente, danos leves e moderados, e os tipos 3 e 4 expressam danos graves ao DNA (**Figura 4**). Utilizando os microscópios de fluorescência citados acima para cada instituição, foram lidas arbitrariamente 100 células em cada lâmina, para ambas as espécies e nos diferentes tratamentos, para que a pontuação total do cometa pudesse ser determinada variando entre

0, o que significa que nenhuma célula apresenta dano no DNA, e 400, o que significa que todas as células têm núcleo/cauda completamente dispersos, representando danos extensos ao DNA.

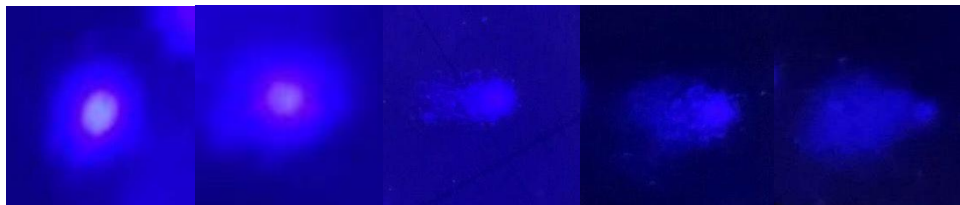


Figura 6- Núcleo das células de *Ruditapes philippinarum*, respectivamente na escala de 0 a 4. Na ordem da esquerda para a direita - tipo 0: sem danos; tipos 1 e 2: danos leves a moderados; tipos 3 e 4: danos extensos ao DNA.

3.5 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram testadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene ($p < 0,05$), respectivamente. As diferenças estatísticas entre o controle e cada tratamento (ou seja, as diferentes concentrações de cada composto) foram analisadas usando uma análise unidirecional (ANOVA) seguida por um teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$) para detectar diferenças significativas em termos de danos no DNA entre os grupos de tratamento e o controle. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism 5*. A porcentagem de danos ao DNA de acordo com a pontuação total do cometa obtida foi calculada no Excel.

4. Resultados

4.1 Sobrevivência

Durante os testes de exposição aos contaminantes (96h), apenas no ensaio feito com *Ruditapes philippinarum* foi observada mortalidade dos animais após a exposição, o mesmo não aconteceu com o ensaio feito com *Anomalocardia flexuosa*, ou seja, ao fim das 96 horas de exposição, todos os organismos desta espécie sobreviveram e foram sacrificados individualmente com bisturi para o processo de retirada da hemolinfa.

No total, apenas 46 dos 65 indivíduos de *R. philippinarum* sobreviveram ao fim do teste de exposição, sendo que apenas os indivíduos das réplicas de ZnAl-LDH-NO₃ apresentaram 100% de sobrevivência (S). Nas concentrações de exposição ao ZnAl-LDH-NO₂ de 1,23 e 100 mg/L a taxa de sobrevivência foi de 100%, e em 11,11 mg/L foi de 60% (2 em cada 5 indivíduos morreram). Quanto às concentrações de LDH-MBT, nenhuma obteve 100% de sobrevivência: 1,23 mg/L (S= 60%), 11,11 mg/L (S= 80%) e

em 100 mg/L todos os indivíduos morreram, não restando réplicas para o teste de genotoxicidade (S= 0%). Por fim, para o MBT livre a taxa de sobrevivência das concentrações de exposição foi: 1,23 mg/L (S= 80%), 11,11 mg/L (S= 40%) e 100 mg/L (S= 20%) (**Tabela 1**).

	1,23 mg/L	11,11 mg/L	100 mg/L
LDH-NO ₂	100%	60%	100%
LDH-NO ₃	100%	100%	100%
LDH-MBT	60%	80%	0%
MBT	80%	40%	20%

Tabela 1- Dados de sobrevivência (S) em porcentagem para *R. philippinarum* em cada concentração após a exposição aos quatro compostos, considerando que foram feitas 5 réplicas por concentração.

Cabe também ressaltar que, como apresentado no **Anexo V - Tabela de Parâmetros** no presente trabalho foi utilizada salinidade 35 para *R. philippinarum*, enquanto em Martins *et al.* (2017) foi usada salinidade 28 para a mesma espécie. Entretanto, como reportado por Velez *et al.* (2016), a salinidade mais alta (até 35) foi benéfica para os organismos, que conseguiram desempenhar melhor seus processos fisiológicos e bioquímicos, além de atingirem uma melhor capacidade de regulação osmótica (Coughlan *et al.*, 2009) e, por isso, este parâmetro não deve ser considerado como um indicador para os resultados de sobrevivência apresentados acima pela espécie de clima temperado.

4.2 Resultados para *Ruditapes philippinarum*

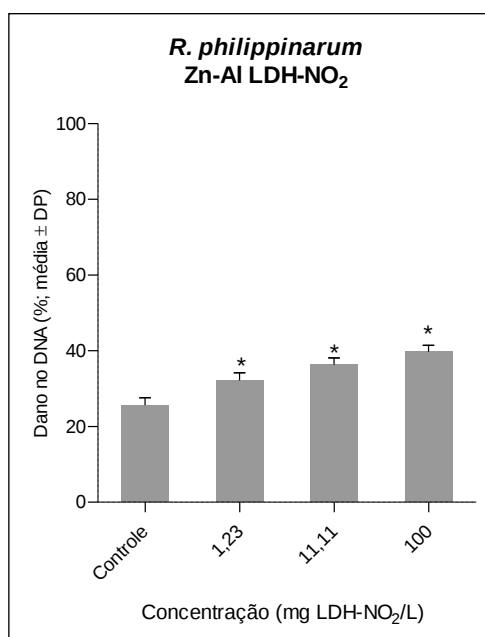
Para a espécie temperada de bivalve (*R. philippinarum*), os resultados estão mostrados na Figura 5, e a porcentagem média de dano no DNA entre as réplicas do controle foi de 25,6%. No que se refere aos compostos analisados neste trabalho, a nanocápsula de nitrito (ZnAl-LDH-NO₂) apresentou 32,1% de dano no DNA na primeira concentração (1,23 mg/L), 36,3% na segunda (11,11 mg/L) e 39,7%, na terceira e mais alta concentração (100 mg/L), e apresentou diferença significativa em comparação ao controle. O dano ao DNA causado pela nanocápsula de nitrato (ZnAl-LDH-NO₃) foi de 35% na primeira concentração (1,23 mg/L), 38,5% na segunda (11,11 mg/L) e 61,9% na última concentração (100 mg/L) e também apresentou diferenças significativas em todos

os tratamentos em comparação ao controle.

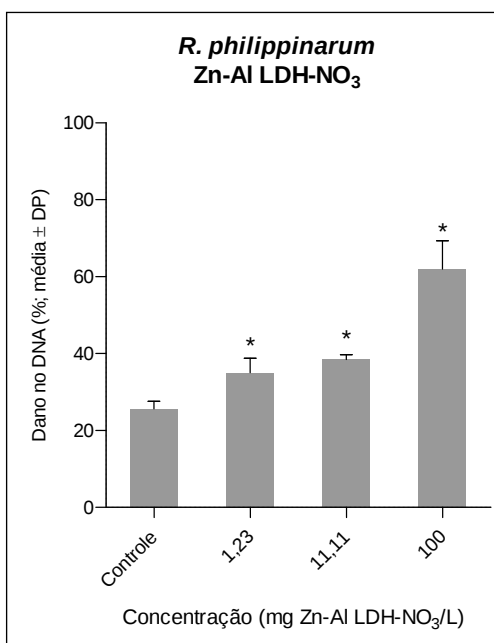
Quanto aos resultados com o anticorrosivo imobilizado pela nanocápsula (LDH-MBT), na concentração mais baixa apresentou 69,2% de dano no DNA, 76,2% na concentração intermediária e na mais alta não houve réplicas restantes a serem consideradas devido a mortalidade de todos os animais deste tratamento durante as 96 horas de exposição. Por este motivo, o gráfico para este composto excepcionalmente não apresenta a coluna para 100 mg/L (**Figura 7d**). No que se refere ao anticorrosivo em sua forma livre (MBT), na primeira concentração houve 82,2% de dano no DNA, 73,8% na segunda e 81,5% na terceira, tendo este composto a genotoxicidade mais alta dentre os quatro testados.

Nos tratamentos deste composto anticorrosivo houve baixa sobrevivência dos indivíduos pós ensaio de exposição, por isso, na terceira e mais alta concentração (100 mg/L) apenas 1 réplica (1 indivíduo) sobreviveu e apresentou 81,5% de dano no DNA partir do cálculo citado na seção 3.4. Esta porcentagem se traduz para a média da última concentração do anticorrosivo em sua forma livre e a coluna do gráfico que a representa, não possui valor de desvio padrão, como é apresentado na **Figura 7c**.

a)



b)



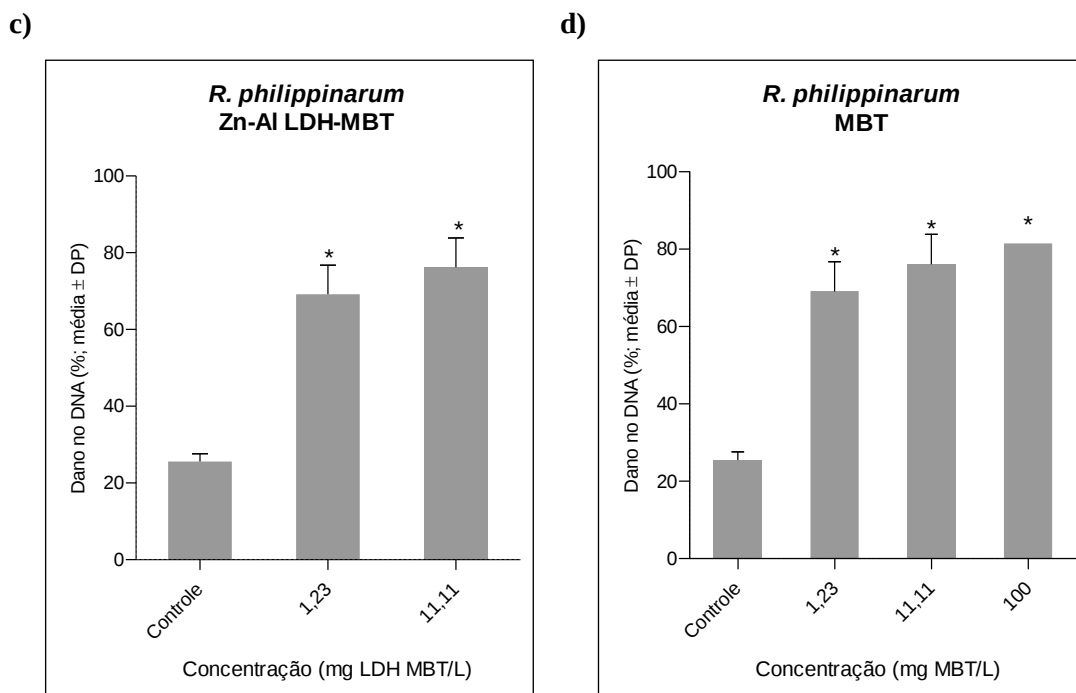


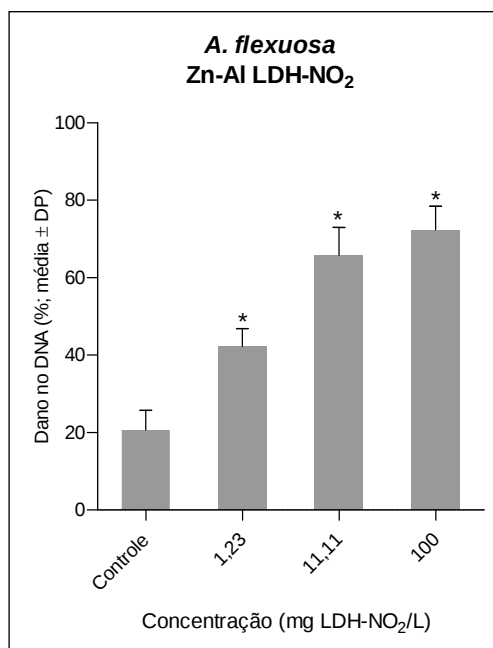
Figura 7- Porcentagem de danos ao DNA em células de *Ruditapes philippinarum* expostas a concentrações crescentes dos compostos LDH-NO₂ (a); LDH-NO₃ (b) e LDH-MBT (c) e MBT livre (d). Valores de significância ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como valores médios percentuais $\pm$ desvio padrão.

4.3 Resultados para *Anomalocardia flexuosa*

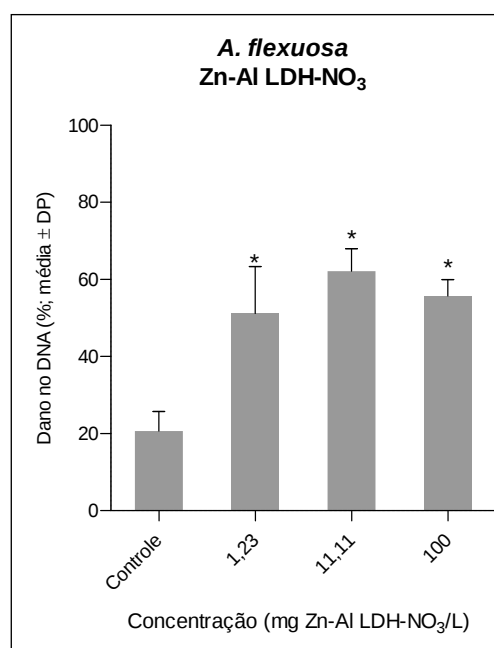
Para a espécie tropical de bivalve (*A. flexuosa*) (Figura 6), o ZnAl-LDH-NO₂ apresentou 42,3% de dano no DNA na primeira concentração (1,23 mg/L), 65,8% na segunda (11,11 mg/L) e 72,3%, na concentração mais alta (100 mg/L), e apresentou diferença estatística significativa com relação ao controle (média de 20,6%) para todos os tratamentos. O dano ao DNA causado pelo ZnAl-LDH-NO₃ foi de 51,5% (1,23 mg/L), 62,1% (11,11 mg/L) e 55,7% (100 mg/L).

Quanto aos resultados para o anticorrosivo imobilizado pela nanoestrutura (ZnAl LDH-MBT) na primeira concentração apresentou 73,4% de dano no DNA, 91,5% na segunda concentração e 88,7% na terceira. Quanto ao anticorrosivo em sua forma livre (MBT), na primeira concentração (1,23 mg/L) o dano no DNA foi de 84,3%, sendo de 97,4% na segunda (11,11 mg/L) e 79,3% na terceira (100 mg/L), apresentando a mais alta genotoxicidade dentre os quatro compostos testados neste trabalho (**Figura 8**).

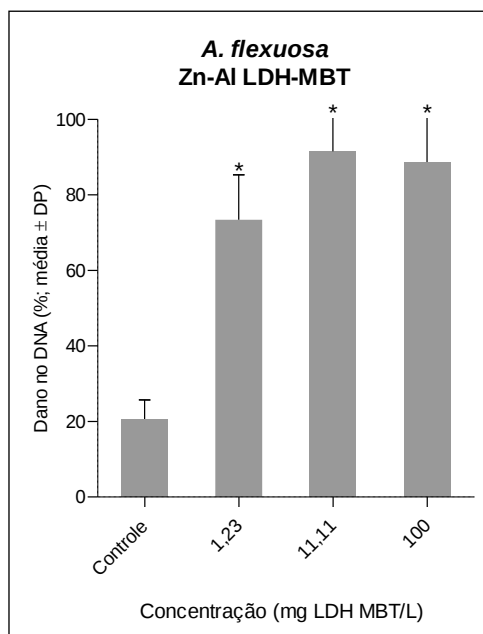
a)



b)



c)



d)

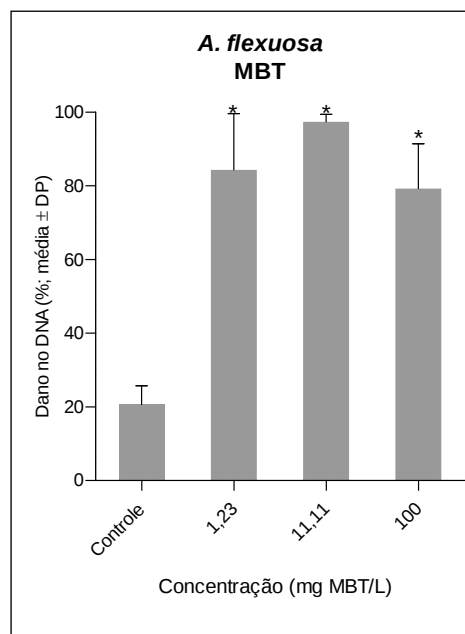


Figura 8- Porcentagem de danos ao DNA em células de *Anomalocardia flexuosa* expostas a concentrações crescentes dos compostos LDH-NO₂ (a); LDH-NO₃ (b), e LDH-MBT (c) e MBT livre (d). Valores de significância ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como valores médios percentuais $\pm$ desvio padrão.

Para estes resultados da espécie tropical *A. flexuosa*, é importante ter conhecimento de que, após o ensaio de eletroforese, 15 lâminas tiveram que ser descartadas devido a inconsistência da agarose, o que inviabilizaria a visualização das células para o ensaio do cometa. Por esse motivo, alguns dos resultados foram expressos com uma menor quantidade de réplicas comparáveis no cálculo da porcentagem do dano, o que influenciou nos valores de média e desvio padrão expressos pelos compostos, em especial o LDH-NO₂ que teve apenas 2 réplicas restantes para análise dos resultados da primeira concentração (1,23 mg/L).

5. Discussão

O presente estudo destaca as descobertas de uma das primeiras avaliações de genotoxicidade de um novo nanomaterial anticorrosivo projetado para aumentar a eficiência de revestimentos anticorrosivos para estruturas metálicas total ou parcialmente submersas em água do mar.

5.1 *Ruditapes philippinarum*

Conforme reportado no tópico 4.1 “Sobrevivência”, foi observada mortalidade de *R. philippinarum* nos tratamentos com MBT e LDH-MBT, indicando efeitos agudos. Comparativamente, em Martins *et al.* (2017) a letalidade também foi observada nessa espécie, na maior concentração (100 mg/L) de LDH-MBT (S= 82%) e em todas as três concentrações de MBT livre: 0,1 mg/L (S = 91%), 10 mg/L (S = 91%) e 100 mg/L (S = 73%). No estudo de 2017, 169 dos 176 indivíduos sobreviveram durante o mesmo tempo de exposição (96 h).

No presente estudo, a letalidade para *R. philippinarum* foi maior que a observada por Martins *et al.* (2017) com os mesmos protocolos de exposição, sendo as concentrações testadas a única diferença: 0,1, 10 e 100 mg/L em 2017 em comparação com 1,23, 11,11 e 100 mg/L no presente trabalho, conforme apresentado anteriormente na **Tabela 1**, o que pode ser um indicador plausível para explicar o cenário de exposição mais letal.

Quanto aos resultados dos ensaios genotoxicológicos realizados no presente trabalho, para *R. philippinarum*, a nanocápsula contendo nitrito (ZnAl-LDH-NO₂) causou a menor genotoxicidade dentre os compostos testados, porém ainda assim, segundo a análise de variância (ANOVA), todas as concentrações apresentaram uma diferença significativa em comparação ao controle que teve média de 25,6%. Comparativamente, o

dano causado no DNA pela nanocápsula de nitrato (ZnAl-LDH-NO₃) foi maior que na de nitrito e, por sua vez, também apresentou diferença significativa em todos os tratamentos em comparação ao controle. O resultado desta comparação mostra que a genotoxicidade ZnAl-LDH-NO₂ < ZnAl-LDH-NO₃, o que corrobora com a segunda hipótese do presente trabalho.

Quanto aos resultados do anticorrosivo nanoencapsulado (LDH-MBT) e livre (MBT), alta genotoxicidade foi expressa por ambos os compostos neste estudo, assim como visto em outros testes ecotoxicológicos em estudos recentes (Tietge *et al.*, 2013; Santos, 2023; Lima, 2023). O ZnAl-LDH-MBT causou o segundo maior percentual de danos ao DNA, com a maior média de dano no DNA equivalendo a 76,2% na segunda concentração (11,11 mg/L). É importante notar que a terceira concentração (100 mg/L) não contém a porcentagem de dano devido a mortalidade de todas as cinco réplicas durante a exposição. Por sua vez, os organismos expostos ao MBT livre apresentaram o maior percentual de danos ao DNA, com a maior média de dano no DNA sendo 82,2%, e todos os tratamentos apresentaram variação significativa em relação ao controle como mostrado na **Figura 7** com o asterisco (*). É importante ressaltar que terceira concentração (100 mg/L) apenas um organismo sobreviveu à exposição ao anticorrosivo, conforme mencionado anteriormente.

Ainda que, comparativamente, as médias de dano no DNA em porcentagem do MBT livre e imobilizado pelo nanomaterial corroborem com a primeira hipótese deste trabalho de que o MBT livre é mais genotóxico do que quando imobilizado pelo nanomaterial (LDH-MBT), os resultados foram relativamente similares na direcção de uma alta genotoxicidade e letalidade nas concentrações mais altas dos dois compostos, sugerindo que a imobilização do MBT no LDH tenha baixa eficiência em reduzir a genotoxicidade.

Ao abordarem os efeitos tóxicos do MBT livre, Martins *et al.* (2017) observaram que após a exposição crônica de *R. philippinarum* ao anticorrosivo, ocorreu uma inibição significativa da acetilcolinesterase, o que indica um comprometimento na neurotransmissão e aponta para um potencial neurotóxico do anticorrosivo. Em outro estudo anterior com embriões de bolacha do mar (Lima, 2023), o LDH-MBT apresentou, na verdade, maior ecotoxicidade do que o MBT livre, o que acredita-se ter ocorrido foi um efeito aditivo, uma vez que o anticorrosivo teve sua toxicidade somada a do nanomaterial, e não amenizada por ele. A comparação dos dados do presente estudo com aqueles da literatura sugere que a redução da toxicidade do MBT após a imobilização em

LDH depende da espécie analisada.

5.2 *Anomalocardia flexuosa*

Para a espécie tropical de bivalve (*A. flexuosa*), a nanocápsula de nitrito (ZnAl-LDH-NO₂) apresentou, na maior concentração (100 mg/L), a maior média de dano no DNA (72,3%) em comparação com a maior média da nanocápsula de nitrato (ZnAl-LDH-NO₃) de 62,1% na segunda concentração. Ao comparar com os resultados dos mesmos compostos para a espécie temperada é evidente que médias de dano no DNA foram maiores para a espécie tropical como mostrado na **Figura 9a e 9b**. Ambos os compostos apresentaram variação significativa em todos os tratamentos em comparação ao controle.

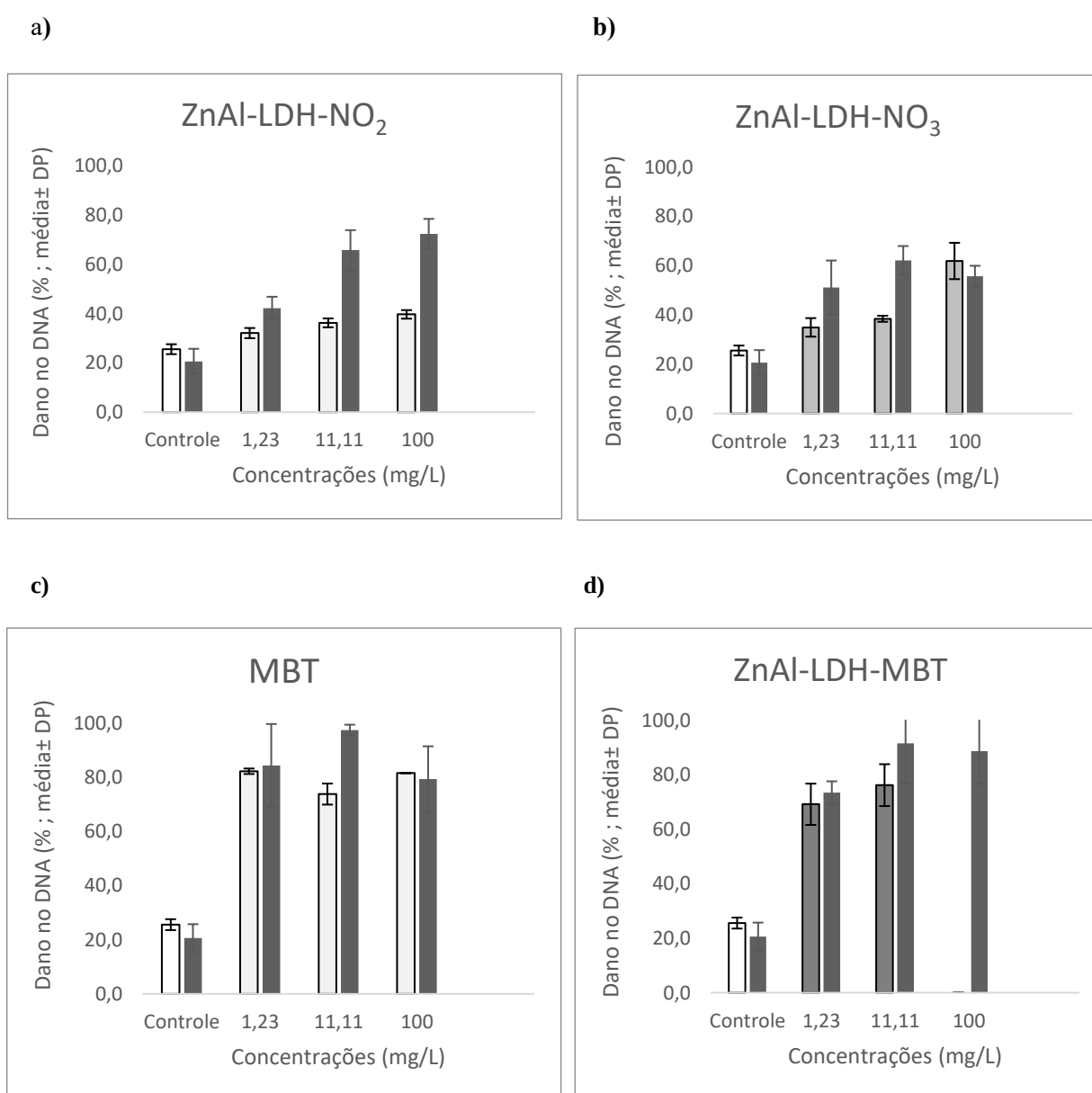


Figura 9- Gráficos comparativos para a média de dano no DNA para as espécies *R. philippinarum*

(cinza claro) e *A. flexuosa* (cinza escuro) para cada composto: LDH-NO₂ (a); LDH-NO₃ (b) e MBT livre (c), e LDH-MBT (d).

Quanto aos resultados do anticorrosivo nanoencapsulado (LDH-MBT) e livre (MBT) mostrado nas **Figuras 9c e 9d**, alta genotoxicidade foi induzida por ambos os compostos com a maior média de dano sendo 91,5% para o MBT nanoestruturado, na segunda concentração, e 97,4% para o MBT livre também na segunda concentração. Assim, o MBT livre causou, sobre a espécie tropical, a maior média de dano no DNA entre todos os compostos testados neste trabalho para ambas as espécies, corroborando com a primeira hipótese deste trabalho.

Outro aspecto a destacar é a liberação dos íons Zn²⁺ e Al³⁺ da estrutura do LDH como visto por Martins *et al.* (2017), que pode ser, ao menos em parte, a causa da genotoxicidade mesmo na forma imobilizada do MBT (ZnAl-LDH-MBT), conforme referido também por Lima (2023) e Santos (2023). A classificação da toxicidade, em ordem crescente, destes dois últimos estudos foi: ZnAl-LDH-MBT > MBT > ZnAl-LDH e MBT > ZnAl LDH-MBT > MgAl-LDH-MBT > Zn Al-LDH > MgAl-LDH, respectivamente. Estes resultados sugeriram que a toxicidade foi influenciada pelo Zn²⁺ (*Echinometria lucunter* e *Mellita quinquesperforata*), pois os tratamentos com ZnAl LDH foram mais tóxicos em comparação com o LDH composto por Mg²⁺.

Os efeitos tóxicos do zinco em bivalves também foram avaliados por Trevisan (2012), o autor expôs duas espécies (*Mytilus edulis* e *Perna perna*) ao metal e observou que a presença de Zn²⁺ nas células pode causar estresse oxidativo, ativar o fator de transcrição dependente de metais, levar a um aumento nos níveis de proteínas de resposta a estresse celular. Ainda a nível intracelular, o zinco afeta diferentes organelas, podendo causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que deixa a célula suscetível a processos patológicos, além de causar danos nas moléculas, como por exemplo a molécula de DNA estudada no presente trabalho.

Na **Figura 9** fica evidente que as médias de dano no DNA foram significativamente maiores para a espécie tropical em todos os compostos na maioria dos tratamentos, o que pode decorrer de uma maior reatividade dos compostos de acordo com a temperatura da água ou mesmo pelo metabolismo mais acelerado das espécies tropicais. Além disso, LDH-NO₂ e LDH-NO₃ foram menos tóxicas do que o MBT e o LDH-MBT para duas espécies de bivalves testadas.

Em 2020, Seniski e colaboradores compararam o LDH-NO₂ com benzotriazol

(BTA- anticorrosivo do qual deriva o mercaptobenzotiazol- MBT), e observaram um aumento da resistência à corrosão, induzindo a formação de uma película passivante na superfície do metal devido à liberação de inibidor de corrosão e captura de íons cloreto. Em 2021, Pellanda e colaboradores fizeram um estudo sobre o LDH carregado com óxido de nitrogênio (NO_x-LDH) e, os resultados em meios de cloreto mostraram que os óxidos de nitrogênio foram intercalados com sucesso na estrutura do LDH, que foram liberados, o que corrobora com o estudo anterior sobre a potencial ação anticorrosiva de nitrito (NO₂).

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo mostraram que o ensaio cometa forneceu uma abordagem confiável para avaliar os efeitos genotóxicos do anticorrosivo MBT e sua forma nanoestruturada com LDH sobre os bivalves *R. philippinarum* e *A. flexuosa*, e confirmou a eficácia do nanomaterial LDH no controle da liberação do anticorrosivo tóxico 2-MBT o que o deixou levemente menos tóxico para ambas as espécies. Porém, embora a imobilização do 2-MBT em nanocápsulas tenha proporcionado alguma proteção aos bivalves, reduzindo os efeitos genotóxicos e letais observados, ainda pode persistir algum perigo aos organismos, uma vez que a porcentagem de dano no DNA foi muito alta nos organismos expostos ao LDH-MBT.

Para o bivalve *R. philippinarum*, integrando todos os parâmetros, a genotoxicidade química dos compostos testados pode ser resumida através da seguinte escala: MBT > LDH-MBT > LDH-NO₃ > LDH-NO₂, enquanto para o bivalve *A. flexuosa*, a genotoxicidade química dos compostos testados pode ser resumida da seguinte forma: MBT > LDH-MBT > LDH-NO₂ > LDH-NO₃, demonstrando que a primeira e a segunda hipótese deste trabalho foram corroboradas para ambas as espécies.

O potencial anticorrosivo do LDH-NO₂ ainda foi pouco avaliado, mas a partir dos resultados apresentados no presente estudo ele se apresenta como um possível inibidor de corrosão menos tóxico que o LDH-MBT, o que o torna um competidor promissor para substituí-lo como uma alternativa mais ambientalmente viável.

Além disso, foi observado que as células dos organismos da espécie tropical apresentaram maior porcentagem de dano no DNA, isto é, foram mais sensíveis aos compostos tóxicos do que os organismos da espécie temperada. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para afirmar se existe diferença na sensibilidade das espécies

tropicais e temperadas que possa esclarecer esses resultados.

7. Referências

- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in organic coatings*, 59(1), 2-20.
- Augustyniak, M., Gladysz, M., & Dziewięcka, M. (2016). The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for science. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 67-76.
- Azevedo, F., Marques, F., Fokt, H., Oliveira, R., & Johansson, B. (2011). Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. *Yeast*, 28(1), 55-61.
- Cardoso, D. N., Silva, A. R. R., Cruz, A., Lourenço, J., Neves, J., Malheiro, C., ... & Loureiro, S. (2017). The comet assay in *Folsomia candida*: A suitable approach to assess genotoxicity in collembolans. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(9), 2514-2520.
- Cardoso, S. P., Almeida, F., Massapust, F. C., Costa, J. D. F., Tebaldi, S., Felipe, L., Araújo, L., Vinícius, M., Sousa, T., Antônio, J. & Gomes, P. (2005). Avaliação de indicadores de uso diverso como inibidores de corrosão. *Química Nova*, 28, (5), 756–760.
- Carneiro, D., Damasceno, É. P., Ferreira, V., Charlie-Silva, I., Tedim, J., Maia, F., ... & Pavlaki, M. D. (2023). Zn-Al layered double hydroxides induce embryo malformations and impair locomotion behavior in *Danio rerio*. *NanoImpact*, 30, 100457.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and molecular mutagenesis*, 46(1), 64-70.
- Choi, S. J., & Choy, J. H. (2011). Effect of physico-chemical parameters on the toxicity of inorganic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 21(15), 5547-5554.
- Chong, K., Wang, W.-X., 2000. Bioavailability of sediment-bound Cd, Cr and Zn to the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 255, 75–92.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249-261.
- Coughlan, B. M., Moroney, G. A., Van Pelt, F. N. A. M., O'Brien, N. M., Davenport, J., & O'Halloran, J. (2009). The effects of salinity on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) using the neutral red retention assay with adapted physiological

- saline solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 58(11), 1680-1684.
- de Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S. A., Borràs, M., Martins, M. G., Costa, P. M., & Pacheco, M. (2015). The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in genetics*, 6, 180.
- Delgado, M., & Pérez-Camacho, A. (2007). Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Revé) and *Ruditapes decussatus* (L.)(Mollusca, Bivalvia): Influence of temperature. *Centro Oceanográfico de A Coruña*.
- Duthie, S.J., Collins, A.R., (1997). The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Radicals Biology Medicine*. 22, 717-724.
- Fan, W., Wang, W.-X., 2001. Sediment geochemical controls on Cd, Cr, and Zn assimilation by the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2309–2317.
- Figueiredo J., et al., 2019. Toxicity of innovative anti-fouling nano-based solutions to marine species. *Environmental Science: Nano*, 50, 75–87.
- Frauches-Santos, C., Albuquerque, M. A., Oliveira, M. C. C., & Echevarria, A. (2014). The corrosion and the anticorrosion agents. *Revista Virtual de Química*, 6(2), 293–309.
- Frenzilli, G. I. A. D. A., Nigro, M. A. R. C. O., & Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation research/reviews in mutation research*, 681(1), 80-92.
- Gaivão, I., & Sierra, L. M. (2014). *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. *Frontiers in genetics*, 5, 304.
- Goyal, M., Kumar, S., Bahadur, I., Verma, C., & Ebenso, E. E. (2018). Organic corrosion inhibitors for industrial cleaning of ferrous and non-ferrous metals in acidic solutions: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 256, 565–573.
- Hahn, A., & Hock, B. (1999). Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(7), 1421-1424.
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.
- Lima, M. L. R. A. (2023). Ecotoxicidade do 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) nas formas livre e nanoestruturada sobre os embriões de bolacha-do-mar *Mellita quinquesperforata*. Universidade Estadual Paulista (UNESP) Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista.

- 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., Avelas, F., Caetano, A. P. F., Tedim, J., Ferreira, M., Freitas, R., Soares, A. M. V. M. & Loureiro, S. (2017). Effects of anovel anticorrosion engineered nanomaterial on the bivalve: *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science: Nano*, 4(5), 1064–1076.
- Maurici D, Aardema M, Corvi R, et al. 3.7. Genotoxicity and Mutagenicity. Alternatives to Laboratory Animals. 2005;33(1_suppl):117-130. doi:10.1177/026119290503301s13
- Morais, W. R., Silva, J. S., Alves, G. F. S., Silva, K. B., Zanta, C. L. D. P. E. S., & Tonholo, J. (2018). Mapeamento Tecnológico e Científico de Novas Composições Inibidoras de Corrosão. *Cadernos de Prospeção*, 11(5), 1579.
- Muller-Karanassos, C., Arundel, W., Lindeque, P. K., Vance, T., Turner, A., & Cole, M. (2021). Environmental concentrations of antifouling paint particles are toxic to sediment-dwelling invertebrates. *Environmental Pollution*, 268, 115754.
- Ohsawa, M. & Suëtaka, W. (1979). Spectro-electrochemical studies of the corrosion inhibition of copper by mercaptobenzothiazole. *Corrosion Science*. 19, 709-722.
- Ostling, G., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.
- Pavlaki, M. D., Araújo, M. J., Cardoso, D. N., Silva, A. R. R., Cruz, A., Mendo, S., ... & Loureiro, S. (2016). Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental pollution*, 215, 203-212.
- Pellanda, A. C., Neto, A. G. C., Carvalho Jorge, A. R. D., Berton, M. A. C., Floriano, J. B., Thomas, S., & Vijayan P, P. (2021). Performance Evaluation of Layered Double Hydroxides Containing Benzotriazole and Nitrogen Oxides as Autonomic Protection Particles against Corrosion. *International Journal of Polymer Science*, 2021(1), 6630194.
- Rahimi, A. & Amiri, S. (2016). Self-healing anticorrosion coating containing 2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptobenzimidazole nanocapsules. *Journal of Polymer Research*, 23(4), 1-10.
- Santos, C. L., Pourrut, B., & Ferreira de Oliveira, J. M. (2015). The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Frontiers in Genetics*, 6, 216.
- Santos, J. V. N. D. (2023). Avaliação da ecotoxicidade crônica de 2-mercaptobenzotiazol livre e nanoestruturado em hidróxidos duplos lamelares. Universidade Estadual Paulista (UNESP) Instituto de Biociências – Campus do

Litorial Paulista.

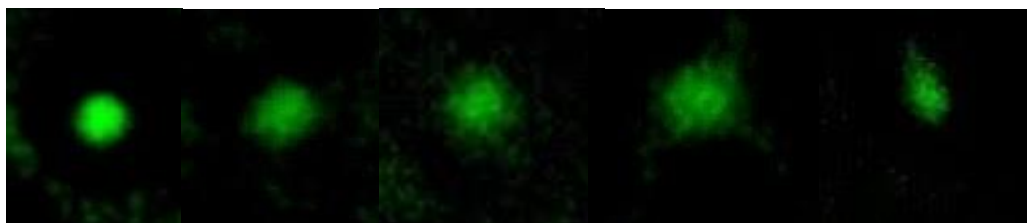
- Santana, L. M., Blasco, J., Abessa, D. M., & Campana, O. (2017). Bioaccumulation kinetics of copper in *Ruditapes philippinarum* exposed to increasing, continuous and pulsed exposure: Implications for growth. *Science of the Total Environment*, 595, 920-927.
- Seniski, A., Monteiro, R. F., Carrera, G. T., Bragança, M. D. O. G. P., & Portella, K. F. (2020). The inhibitory and comparative effects of Zn-Al layered double hydroxide microcontainers intercalated with benzotriazole and nitrite for corrosion protection coatings on AISI 1010 carbon steel. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 25(2), e-12664.
- Seriani, R.; Abessa, D.M.S.; Pereira, C.D.S.; Kirschbaum, A.A.; Abujamara, L.D.; Buruaem, L.M.; Félix, C.; Turatti, G.C.R.; Prado, L.R.B.; Sousa, E.C.P.M. & Ranzani-Paiva, M.J.T. (2013). Blood Parameters of Estuarine and Marine Fish as Non-Destructive Pollution Biomarkers. In: Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems. E.A. ALMEIDA & C.A.O. RIBEIRO (Orgs). CRC Press. Boca Raton, FL, USA, p. 182-205.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Shugart, L., & Theodorakis, C. (1998). New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy*, 11(2-3), 119-127.
- Solanky, D., & Haydel, S. E. (2012). Adaptation of the neutral bacterial comet assay to assess antimicrobial-mediated DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods*, 91(2), 257-261.
- Tedim, J., Kuznetsova, A., Salak, A. N., Montemor, F., Snihirova, D., Pilz, M., Zheludkevich, M. L. & Ferreira, M. G. S. (2012). Zn-Al layered double hydroxides as chloride nanotraps in active protective coatings. *Corrosion Science*, 55, 1–4.
- Tedim, J., Zheludkevich, M. L., Salak, A. N., Lisenkov, A. & Ferreira, M. G. S. (2011). Nanostructured LDH-container layer with active protection functionality. *Journal of Materials Chemistry*, 21(39), 15464.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Tietge, J. E., Degitz, S. J., Haselman, J. T., Butterworth, B. C., Korte, J. J., Kosian, P. A., ... & Hornung, M. W. (2013). Inhibition of the thyroid hormone pathway in *Xenopus laevis* by 2-mercaptobenzothiazole. *Aquatic toxicology*, 126, 128-136.
- Trevisan, R. (2012). Defesas celulares e sistema antioxidante em bivalves marinhos

(*Mytilus edulis* e *Perna perna*) expostos a metais.

- Uc-Peraza, R. G., Delgado-Blas, V. H., Rendón-von Osten, J., Castro, Í. B., Proietti, M. C., & Fillmann, G. (2022). Mexican paradise under threat: The impact of antifouling biocides along the Yucatán Peninsula. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 128162.
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A. M., & Freitas, R. (2016). Combined effects of seawater acidification and salinity changes in *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Toxicology*, 176, 141-150.
- Wu, F.-L., M. Hussein, W., P. Ross, B. & P. McGeary, R. (2012). 2-Mercaptobenzothiazole and its Derivatives: Syntheses, Reactions and Applications. *Current Organic Chemistry*, 16(13), 1555–1580.
- Wu, X., Wiame, F., Maurice, V. & Marcus, P. (2020). 2-Mercaptobenzothiazole corrosion inhibitor deposited at ultra-low pressure on model copper surfaces. *Corrosion Science*, 166(Janeiro), 108464.
- Zheludkevich, M. L., Poznyak, S. K., Rodrigues, L. M., Raps, D., Hack, T., Dick, L. F., ... & Ferreira, M. G. S. (2010). Active protection coatings with layered double hydroxide nanocontainers of corrosion inhibitor. *Corrosion Science*, 52(2), 602-611.
- Zheludkevich, M. L., Tedim, J., & Ferreira, M. G. S. (2012). “Smart” coatings for active corrosion protection based on multi-functional micro and nanocontainers. *Electrochimica Acta*, 82, 314-323.

ANEXO I

Núcleo das células de *Anomalocardia flexuosa* na escala de 0 a 4, respectivamente. Na ordem da esquerda para a direita - tipo 0: sem danos; tipos 1 e 2: danos leves a moderados; tipos 3 e 4: danos extensos ao DNA (Corante usado: brometo de etídio).



ANEXO II

Tabela com a contagem de células de *R. philippinarum*

		Tipos de Cometa				
Controle	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
	1	10	83	4	2	1
	2	12	82	4	1	1
	3	-	-	-	-	-
	4	3	81	15	1	0
	5	12	80	7	1	0
LDH-NO ₂	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	1	81	12	3	3
	2	0	85	10	4	1
	3	0	82	16	1	1
	4	1	73	19	4	3
	5	0	72	19	7	2
LDH-NO ₂	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	0	62	25	11	2
	2	0	71	20	8	1
	3	-	-	-	-	-
	4	0	72	16	9	3
	5	-	-	-	-	-
LDH-NO ₂	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	0	59	24	10	7
	2	0	60	23	12	5
	3	-	-	-	-	-
	4	0	67	14	12	7
	5	0	68	19	9	4

LDH-NO ₃	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	0	84	13	1	2
	2	0	80	10	4	6
	3	0	71	19	9	1
	4	0	72	20	5	3
	5	0	61	20	14	5
LDH-NO ₃	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	0	63	25	9	3
	2	0	63	21	11	5
	3	0	64	24	11	1
	4	0	64	22	14	0
	5	0	61	21	15	3
LDH-NO ₃	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	0	17	13	26	44
	2	0	27	28	30	15
	3	0	27	20	29	24
	4	0	28	22	35	15
	5	0	30	30	29	11
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	0	7	19	43	31
	3	0	7	25	39	29
	4	-	-	-	-	-
	5	0	23	23	43	11
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	0	5	1	41	53
	3	0	7	10	51	32
	4	0	6	14	52	28
	5	0	14	28	35	23
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	0	2	15	40	43
	3	0	4	7	43	46
	4	0	3	10	40	47
	5	-	-	-	-	-
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	-	-	-	-	-

	2	-	-	-	-	-
	3	0	10	14	36	40
	4	0	11	19	45	25
	5	-	-	-	-	-
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	0	5	8	43	44
	5	-	-	-	-	-

ANEXO III

Tabela com a contagem de células de *A. flexuosa*

		Tipos de Cometa				
Controle	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
	1	26	50	20	4	0
	2	26	54	16	4	0
	3	-	-	-	-	-
	4	50	38	12	0	0
	5	42	50	6	2	0
LDH-NO2	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	2	38	42	12	6
	4	-	-	-	-	-
	5	12	44	22	20	2
LDH-NO2	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	0	4	46	34	16
	2	0	6	14	50	30
	3	0	14	44	30	12
	4	0	6	50	36	8
	5	-	-	-	-	-
LDH-NO2	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	0	4	36	32	28
	2	0	8	38	32	22
	3	0	2	16	46	36
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
LDH-NO3	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4

1,23 mg/L	1	8	54	28	10	0
	2	0	24	36	30	10
	3	0	28	50	18	4
	4	0	6	46	36	12
	5	-	-	-	-	-
LDH-NO3	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	0	24	44	26	6
	2	0	8	28	46	18
	3	0	4	40	42	14
	4	0	10	46	36	8
	5	2	4	48	38	8
LDH-NO3	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	6	30	34	22	8
	2	0	24	36	30	10
	3	8	24	28	22	18
	4	0	12	48	30	10
	5	0	20	42	20	18
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	0	12	38	24	26
	2	0	2	32	38	28
	3	0	14	30	36	20
	4	0	4	36	42	18
	5	0	0	0	24	76
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	0	0	36	30	34
	2	-	-	-	-	-
	3	0	0	0	0	100
	4	-	-	-	-	-
	5	0	0	0	0	100
LDH-MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	0	0	0	0	100
	2	0	0	8	50	42
	3	0	0	10	26	64
	4	0	0	28	58	14
	5	0	0	0	0	100
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
1,23 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	0	0	0	0	100
	4	0	8	30	38	24
	5	0	0	20	26	54
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
11,11 mg/L	1	-	-	-	-	-
	2	0	0	0	4	96

	3	0	0	0	22	78
	4	0	0	0	8	92
	5	0	0	0	8	92
MBT	Réplica	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
100 mg/L	1	0	0	46	40	14
	2	0	0	12	58	30
	3	-	-	-	-	-
	4	0	0	0	35	65
	5	-	-	-	-	-

ANEXO IV

PARÂMETROS INICIAIS <i>A. flexuosa</i>					
		pH	Sal.	OD	T(°C)
CONTROLE		7,33	20	7,39	25
LDH-NO ₂	1,23	7,15	20	6,49	25
	11,11	7,24	20	7,43	25
	100	7,11	20	7,45	25
LDH-NO ₃	1,23	7,15	20	7,47	25
	11,11	7,02	20	7,33	25
	100	7,21	20	7,44	25
LDH-MBT	1,23	7,32	20	7,42	25
	11,11	7,2	20	7,37	25
	100	7,26	20	7,37	25
MBT	1,23	7,32	20	7,42	25
	11,11	7,2	20	7,37	25
	100	7,26	20	7,37	25

PARÂMETROS FINAIS <i>A. flexuosa</i>					
		pH	Sal.	OD	T(°C)
CONTROLE		7,71	20	6,26	25
LDH-NO ₂	1,23	7,71	21	5,06	25
	11,11	7,49	22	6,11	25
	100	7,34	23	5,45	25
LDH-NO ₃	1,23	7,46	21	4,95	25
	11,11	7,5	22	6,36	25
	100	7,39	20	5,39	25
LDH-MBT	1,23	7,48	23	5,63	25
	11,11	7,52	23	3,9	25
	100	7,53	24	4,95	25
MBT	1,23	7,44	22	3,82	25
	11,11	7,66	22	4,87	25
	100	7,42	23	4,21	25

ANEXO V

PARÂMETROS INICIAIS <i>R. philippinarum</i>						
		pH	Sal.	OD	Conduct.	T(°C)
CONTROLE		7,72	34	5,8	51	20
LDH-NO₂	1,23	7,73	34	5	52,2	20
	11,11	7,7	34	5,3	53,2	20
	100	7,77	34	7	50,7	20
LDH-NO₃	1,23	7,79	34	5,7	50,7	20
	11,11	7,81	34	5,7	51	20
	100	7,63	34	6,1	53,2	20
LDH-MBT	1,23	7,84	34	5,1	48,4	20
	11,11	7,81	34	6,3	52,3	20
	100	7,84	34	8,2	50,9	20
MBT	1,23	7,92	34	6,2	51,1	20
	11,11	7,76	34	7,4	49,6	20
	100	7,78	34	6,5	50,7	20

PARÂMETROS FINAIS <i>R. philippinarum</i>						
		pH	Sal.	OD	Conduct.	T(°C)
CONTROLE		7,74	38	6,5	58,7	20
LDH-NO₂	1,23	7,74	38	8,7	54,3	20
	11,11	7,8	38	8,9	52,3	20
	100	7,77	38	6,3	50,2	20
LDH-NO₃	1,23	7,71	40	8,1	56,9	20
	11,11	7,66	40	7,5	57,8	20
	100	7,74	38	7,4	55,2	20
LDH-MBT	1,23	7,8	38	7,7	51,3	20
	11,11	7,83	38	7,4	55	20
	100	7,93	39	8,2	55,3	20
MBT	1,23	7,8	39	7,7	59,6	20
	11,11	7,94	41	7,2	56,1	20
	100	7,9	41	7,6	56,4	20

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: MARIA LUIZA REGUEIRA ALVES LIMA

Título: "Genotoxicidade do 2-mercaptobenzotiazol (2-MBT) nas formas livre e nanoestruturada sobre bivalves"

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
Dra. Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly	Aprovada

PARECER:

A aluna fez uma boa apresentação e respondeu bem aos questionamentos, demonstrando maturidade e conhecimento sobre o estudo. Foram solicitadas somente algumas correções menores.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Maria Luiza Regueira Alves Lima** obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 12 de dezembro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA**
Data: 12/12/2024 11:20:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Documento assinado digitalmente
 **GUACIRA DE FIGUEIREDO EUFRASIO PAULY**
Data: 12/12/2024 11:29:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Guacira de Figueiredo Eufrásio Pauly