

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE CRÔNICA DE
2-MERCAPTOBENZOTIAZOL LIVRE E NANOESTRUTURADO EM
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES**

JULIANA VITORIA NICOLAU DOS SANTOS

**SÃO VICENTE – SP
2023**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE CRÔNICA DE
2-MERCAPTOBENZOTIAZOL LIVRE E NANOESTRUTURADO EM
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES**

Discente: Juliana Vitoria Nicolau dos Santos

Docente orientador: Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

Co-orientador: Roberto Carlos Domingues Martins

Co-orientador: Fernando César Perina

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus do Litoral Paulista,
UNESP, para obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade de Ambientes Costeiros

SÃO VICENTE – SP

2023

S237a Santos, Juliana Vitoria Nicolau dos
Avaliação da Ecotoxicidade Crônica de 2-Mercaptobenzotiazol
Livre e Nanoestruturado em Hidróxidos Duplos Lamelares / Juliana
Vitoria Nicolau dos Santos. -- São Vicente, 2023
50 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, São Vicente
Orientador: Denis Moledo de Souza Abessa
Coorientador: Roberto Carlos Domingues Martins

1. Anticorrosivos. 2. Nanotoxicidade. 3. *Echinometra lucunter*. 4.
Nitokra sp.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a empresa *Smallmatek* por fornecer os compostos utilizados nesta pesquisa e todo o esforço da Prof. Dra. Cristiane Ottoni para que estes chegassem até nós. Sou igualmente grata à parceria bilateral com os pesquisadores do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e outros laboratórios da Universidade de Aveiro (UA) no âmbito do projeto NANOGREEN, o qual tenho orgulho de integrar.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Denis Abessa, Dr. Roberto Martins e Dr. Fernando Perina por confiarem no meu trabalho e na minha decisão de continuá-lo em paralelo à um trabalho de 40 horas semanais. Sou eternamente grata por toda paciência, apoio e tantos ensinamentos ao longo dos últimos quatro anos. Ensinamentos que ultrapassam a esfera acadêmica e constituem valores que carrego comigo.

Sou grata ao Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática, em especial Carol Feitosa, cujas contribuições como banca do exame de qualificação e toda ajuda na etapa final foram fundamentais para a realização desse trabalho! Apoio que também veio de Guacira Eufrazio, que até vidraria minha lavou. Agradeço por serem uma inspiração para mim como mulher e pesquisadora. Agradeço a Isabella Beverari, Letícia Albanit e Débora Santana pelo auxílio nos experimentos e cuidados ao cultivo de *Nitokra* sp., além disso, por toda ajuda com vidrarias, mas principalmente, por serem incríveis e ótimas companhias de laboratório. Agradeço a Thaisa Ralha e Maria Luiza pelos mesmos motivos e por me acolherem tão bem! Por se deslocarem, ficarem altas horas me ajudando com experimentos e sempre aparecerem quando eu peço socorro. Jamais saberei como retribuir tanto apoio e carinho.

Agradeço a Mariana Bruni, por ser essa pessoa tão incrível e que me acompanha nessa jornada desde 2019. Amo tê-la como minha dupla e acompanhar suas vitórias! Este trabalho não existiria sem ela, que nunca me abandonou. Ela é brilhante e vai viver coisas incríveis porque merece.

Agradeço a Dra. Paloma Choueri pela parceria com o NEPEA e, principalmente, pela doação de dois cultivos de *Nitokra* sp. para a realização desta pesquisa. Sou muito grata por sempre mostrar-se tão solícita!

Agradeço ao time *Technical Knowledge and Innovation* (TKI) da Arcadis Brasil, em especial Rapha, por ser meu parceiro nº 1 desde o primeiro dia, Jaque por ser a melhor líder que eu poderia ter e Bruno por todo apoio e companhia na coleta de *Echinometra lucunter*. Obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem. Trabalhar ao lado de vocês é um prazer gigante!

Agradeço ao Thiago Godoy de Oliveira por ser tão genial e companheiro ao longo dessa jornada. Reconheço seu esforço em ficar acordado ao meu lado enquanto eu escrevia a dissertação, por atender ligações aleatórias para responder dúvidas de $C1.V1 = C2.V2$ no meio de experimentos. Sou imensamente grata por nunca duvidar que eu seria capaz de dar conta e, principalmente, sempre me acolher quando eu mesma não acreditava nisso.

Agradeço a Sandra Dunder por todo acolhimento ao acompanhar minha evolução desde 2016. Agradeço aos meus amigos Guilherme Rey, Mariana Nascimento, Carol Nascimento, José Augusto, Flavia Freitas, Sabrina Santos, Amanda Fernandes, Giulia Sposito, Fernanda Cabral e Wilson Rocha por serem minha única e magnífica rede de apoio há anos, não me abandonarem e respeitarem esses dois últimos anos caóticos. Agradeço por entenderem que os quero perto, apesar da intensa dedicação ao trabalho e a pesquisa.

Agradeço meus pais, Josefa e Aparecido, por me apoiarem e fornecerem absolutamente todos os recursos que podiam para garantir que eu tivesse o tudo que precisasse e mais. Agradeço as minhas avós Joana e Maria por sempre orarem por mim e torcerem tanto pro meu sucesso e felicidade. Agradeço ao meu irmão caçula Jorge por me ensinar o que é amor e me incentivar a continuar aqui para ser uma pessoa cada vez melhor.

RESUMO

A corrosão é um fenômeno natural definido como a decomposição gradativa do metal, sendo provocada pela reação química e/ou eletroquímica deste material com o ambiente circundante. A prevenção deste processo consiste na aplicação de compostos ativos em superfícies metálicas, como o 2-mercaptobenzotiazol (MBT), inibidor de corrosão amplamente utilizado nas indústrias petrolífera e naval. As restrições ambientais sobre o uso destes compostos requerem o desenvolvimento de produtos inovadores, eficazes, não-tóxicos e se possível, biodegradáveis. Dessa forma, o encapsulamento destes compostos ativos em nanomateriais manufaturados (NM) apresenta-se como uma alternativa promissora, que visa a otimização de seu uso e redução de impactos ambientais associados. Neste sentido, o objetivo desta pesquisa é avaliar o potencial da imobilização do anticorrosivo 2-mercaptobenzotiazol hidróxidos duplos lamelares (LDH, do inglês *Layered Double Hydroxides*) em reduzir a toxicidade do composto ativo sobre o desenvolvimento embriolar do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e a taxa de reprodução do copépodo *Nitokra* sp. Para tal, ensaios ecotoxicológicos foram executados de modo a estimar a toxicidade do (A) inibidor de corrosão MBT, (B) MBT imobilizado em LDH-NO₃ (MgAl LDH-MBT e ZnAl LDH-MBT) e dos (C) nanomateriais vazios (MgAl LDH e ZnAl LDH) para a avaliação da toxicidade das argilas aniônicas na ausência do inibidor de corrosão. As soluções-testes foram preparadas considerando as concentrações de 0,015; 0,046; 0,137; 0,41; 1,23 e 3,7 mg L⁻¹ e um período de exposição crônico para ambos os organismos-teste. Os resultados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, seguidos de ANOVA e o teste de *Dunnnett*. O cálculo das Concentrações de Efeito para 50% dos organismos (CE₅₀) foi realizado através de regressão não linear e a análise de variância multifatorial permutacional (PERMANOVA) foi executada de modo a comparar os diferentes tratamentos nas concentrações testadas. Os resultados obtidos para o ouriço-do-mar *E. lucunter* indicaram maior toxicidade para MBT livre (CE₅₀ = 0,020) mg L⁻¹), em comparação a MgAl LDH MBT (CE₅₀ = 0,055 mg L⁻¹), e ZnAl LDH MBT (CE₅₀ = 0,054 mg L⁻¹). Verificou-se também que ZnAl LDH (CE₅₀ = 0,107 mg L⁻¹) parece ser mais tóxico para este organismo-teste do que MgAl LDH (CE₅₀ = 0,368 mg L⁻¹). Os experimentos realizados com *Nitokra* sp. não indicaram diferença estatística entre o controle e as concentrações testadas de MgAl LDH, ZnAl LDH e MgAl LDH MBT. A respeito de MBT livre e ZnAl LDH MBT, entretanto, os valores de CE₅₀ demonstraram menor toxicidade para o inibidor de corrosão nanoestruturado (CE₅₀ = 0,520 mg L⁻¹) em comparação à sua forma livre (CE₅₀ = 0,223 mg L⁻¹). O ZnAl LDH apresentou maior toxicidade para embriões de ouriço-do-mar e para *Nitokra* sp., em comparação a MgAl LDH; atribui-se esses efeitos a liberação de íons Zn²⁺ durante o período de exposição. Ressalta-se também que a exposição de fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. a ZnAl LDH MBT, apresentou uma curva dose-resposta bifásica, caracterizando-se o fenômeno hormese, ou seja, efeitos benéficos em baixas concentrações. Ainda assim, as toxicidades deste composto e do MBT livre podem estar associadas com a ingestão destas substâncias a partir de sua interação com a matéria orgânica, provocando sua aglomeração. De maneira geral, a imobilização em nanomateriais demonstrou reduzir a toxicidade de MBT a respeito dos efeitos crônicos observados para ambos os organismos-teste. Os resultados do presente estudo sugerem que a alternativa mais promissora é o uso de nanoargilas a base de MgAl, no que se refere a redução da toxicidade crônica para organismos aquáticos neotropicais.

Palavras-chave: nanomateriais manufaturados; anticorrosivos; *Echinometra lucunter*; *Nitokra* sp; nanotoxicidade.

ABSTRACT

Corrosion is a natural phenomenon defined as the gradual decomposition of metal, caused by chemical and electrochemical reactions with the surrounding environment. Preventing this process involves the application of active compounds, such as 2-mercaptobenzothiazole (MBT), a corrosion inhibitor widely used in the oil and naval industries, on metallic surfaces. Environmental restrictions on the use of these compounds require the development of effective, non-toxic, and, if possible, biodegradable products. The encapsulation of such anticorrosives in manufactured nanomaterials (NM) presents itself as a promising alternative, which aims to optimize its use and reduce the associated environmental impacts. The main goal of this research is to evaluate if the immobilization of the anticorrosive 2-mercaptobenzothiazole in Layered Double Hydroxides (LDH) can reduce the toxicity of the active compound on the embryolarval development of the sea urchin *Echinometra lucunter* and reproduction rate of copepods *Nitokra* sp. To this end, ecotoxicological assays were executed to estimate the toxicity of (A) MBT corrosion inhibitor, (B) MBT immobilized in LDH-NO₃ (MgAl LDH-MBT and ZnAl LDH-MBT), and (C) unloaded nanomaterials (MgAl LDH and ZnAl LDH), to evaluate the toxicity of anionic clays in the absence of the corrosion inhibitor. The test solutions were prepared considering 0.015; 0.046; 0.137; 0.41; 1.23 and 3.7 mg L⁻¹ concentrations and a chronic exposure period for both test organisms. The results were submitted to normality and variances homogeneity tests, followed by ANOVA and Dunnett's test. The Effective Concentrations for 50% of the organisms (EC₅₀) were calculated through a non-linear regression and the permutational multifactorial analysis of variance (PERMANOVA) was conducted to compare the different treatments at the tested concentrations. Regarding the sea urchin *E. lucunter*, the results indicated greater toxicity for the free MBT (EC₅₀ = 0.020 mg L⁻¹), as to MgAl LDH MBT (EC₅₀ = 0.055 mg L⁻¹), and ZnAl LDH MBT (EC₅₀ = 0.054 mg L⁻¹). It was also found that ZnAl LDH (EC₅₀ = 0.107 mg L⁻¹) appears to be more toxic to the embryos than MgAl LDH (EC₅₀ = 0.368 mg L⁻¹). The *Nitokra* sp. experiments did not exhibit statistical differences between the means of MgAl LDH, ZnAl LDH, and MgAl LDH MBT. Concerning the free MBT and ZnAl LDH MBT, however, EC₅₀ values demonstrated lower toxicity for the nanostructured corrosion inhibitor (EC₅₀ = 0.520 mg L⁻¹) compared to its free form (EC₅₀ = 0.228 mg L⁻¹). ZnAl LDH showed higher toxicity to sea urchin embryos and copepods, when compared to MgAl LDH, and these effects can be attributed to the release of Zn²⁺ ions during the exposure period. It is also noteworthy that the exposure of ovigerous females of *Nitokra* sp. to ZnAl LDH MBT caused a bimodal dose-response curve, characterizing a hormesis phenomenon, indicating stimulatory effects at low concentrations. Nonetheless, the toxicity of this compound and free MBT may also be associated with the ingestion of these substances after their interaction with organic matter, possibly related with particles' agglomeration and consequent sinking to the bottom. Overall, immobilization on nanomaterials has been shown to reduce MBT toxicity of toxic effects for both test organisms. This study suggests that the most promising alternative is the use of MgAl-based nanoclays, in terms of reducing chronic toxicity of MBT to neotropical aquatic organisms.

Keywords: manufactured nanomaterials; anticorrosives; *Echinometra lucunter*; *Nitokra* sp; nanotoxicity.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. 2-Mercaptobenzotiazol (MBT)	13
1.2. Hidróxidos Duplos Lamelares.....	14
1.3. Ecotoxicologia.....	16
1.3.1. Organismos-teste.....	17
1.3.1.1. <i>Echinometra lucunter</i>	17
1.3.1.2. <i>Nitokra</i> sp.	17
2. Objetivos	19
3. Materiais e Método.....	20
3.1. Ensaio crônico de curta duração com <i>Echinometra lucunter</i>	20
3.1.1. Ensaio de fecundidade com <i>Nitokra</i> sp.	21
3.2. Soluções-teste.....	22
3.2.1. Substâncias de referência	23
3.3. Garantia de qualidade dos ensaios de toxicidade	24
3.4. Análise dos resultados.....	24
4. Resultados	26
4.1. Ensaio com substância de referência	26
4.2. Ensaio com anticorrosivos e hidróxidos duplos lamelares	28
4.2.1. <i>Echinometra lucunter</i>	28
4.2.2. <i>Nitokra</i> sp.	31
5. Discussão	35
6. Conclusão	41
7. Referências Bibliográficas	43
Apêndice A.....	57
Apêndice B	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do copépodo bentônico <i>Nitokra</i> sp (extraído de Lotufo & Abessa, 2002).	18
Figura 2. Sensibilidade dos embriões de <i>Echinometra lucunter</i> expostos a concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (substância de referência). (*) Efeito significativo com relação ao controle.....	26
Figura 3. Resultados do ensaio agudo de sensibilidade com fêmeas ovadas do gênero <i>Nitokra</i> sp expostas a concentrações de Sulfato de Zinco (substância de referência). (*) Efeito significativo com relação ao controle.	27
Figura 4. Desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i> exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares (MgAl LDH e ZnAl LDH), MBT livre e imobilizado (MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT). (*) Efeito significativo com relação ao controle.	29
Figura 5. Comparação do desenvolvimento embriolarval de <i>Echinometra lucunter</i> exposto a MBT, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT.	30
Figura 6. Comparação do desenvolvimento embriolarval de <i>Echinometra lucunter</i> exposto a MgAl LDH e ZnAl LDH.	31
Figura 7. Resultados do teste de fecundidade com fêmeas ovadas do gênero <i>Nitokra</i> sp expostas à concentrações de hidróxidos duplos lamelares (MgAl LDH e ZnAl LDH), MBT livre e imobilizado (MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT). (*) Efeito significativo com relação ao controle.	32
Figura 8. Comparação entre a taxa de fecundidade média de <i>Nitokra</i> sp. exposto a MBT, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT.	33
Figura 9. Comparação entre a taxa de fecundidade média de <i>Nitokra</i> sp. exposto a MgAl LDH e ZnAl LDH.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura e propriedades físico-químicas do 2-mercaptobenzotiazol.....	13
Tabela 2. Sensibilidade das fêmeas ovadas de <i>Nitokra</i> sp. (lotes 1 e 2) expostas à substância de referência Sulfato de Zinco.	27
Tabela 3. Resultados ecotoxicológicos dos ensaios de desenvolvimento embriolarval com <i>Echinometra lucunter</i> (mg L ⁻¹).....	29
Tabela 4. Resultados ecotoxicológicos do ensaio de fecundação com fêmeas ovadas de <i>Nitokra</i> sp. (mg L ⁻¹).	32

ÍNDICE DE SIGLAS

CE₅₀ – Concentração de Efeito para 50% da população

CL₅₀ – Concentração Letal para 50% da população

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

LDH – *Layered Double Hydroxides*

MBT– 2-mercaptobenzotiazol

NEPEA – Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática

UNISANTA – Universidade Santa Cecília

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

U.S. EPA – *United States Environmental Protection Agency*

DSS – Dodecil Sulfato de Sódio

NM – Nanomateriais Manufaturados

1. Introdução

A corrosão é um fenômeno natural definido como a decomposição gradativa do metal, sendo provocada pela reação química e/ou eletroquímica deste material com o ambiente circundante (Kelly *et al.*, 2003). Sua ocorrência está sujeita a fatores ambientais como o pH, temperatura e umidade, assim como a presença de gases, sais e espécies de eletrólitos na superfície do metal (Raja *et al.*, 2016). Considerada um dano inevitável, a corrosão afeta tubulações, plataformas de petróleo, embarcações e outras estruturas metálicas, provocando prejuízos que podem atingir cerca de 4% do Produto Interno Bruto (PIB) de um país desenvolvido (Jain *et al.*, 2020). Em vista disso, o controle de processos corrosivos em estruturas metálicas é fundamental em termos técnicos, econômicos e ambientais (Olajire, 2017). Atualmente, os principais métodos anticorrosivos incluem a aplicação de proteção catódica e anódica, revestimentos e/ou inibidores de corrosão em superfícies metálicas (Frauches-Santos *et al.*, 2014). O emprego de cada técnica depende da natureza, quantidade e local da corrosão. Além disso, outras variáveis, como a composição e propriedades físicas do fluido corrosivo, bem como a temperatura, composição e solubilidade dos produtos da corrosão, também devem ser consideradas (Sanyal, 1981; Oliveira, 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). Fatores determinantes incluem a alta salinidade e concentração de oxigênio dissolvido, o que potencializa significativamente a progressão do processo corrosivo. Ademais, a água do mar pode sofrer contaminação por ácidos, provocando a diminuição de seu pH, atingindo o valor de 5 ou menos em determinadas situações (Wiener & Salas, 2005; Frauches-Santos *et al.*, 2014). Considerando as variáveis supracitadas, a tecnologia mais indicada para a proteção de metais expostos a estas condições é a aplicação de compostos inibidores de corrosão (IC) (Chigondo & Chigondo, 2016).

Os inibidores de corrosão correspondem a quaisquer aditivos ou substâncias químicas que, uma vez aplicados em um sistema corrosivo, retardam ou impedem o progresso da corrosão entre a superfície do metal e o meio (Raja *et al.*, 2016). Estes aditivos são amplamente utilizados na indústria petrolífera, sendo fundamentais na proteção interna de oleodutos, gasodutos e caldeiras. Na indústria naval, são incorporados na formulação de tintas marinhas aplicadas na superfície de navios e embarcações (Mainier & Silva, 2010; Martins *et*

al., 2017). Os IC podem ser classificados de acordo com a sua composição (orgânica ou inorgânica) ou mecanismo de ação (catódicos, anódicos, mistos ou de adsorção) (Morais *et al.*, 2018).

Os IC de composição inorgânica são formulados com base em cromatos, óxidos e nitritos. Estes IC foram produzidos e utilizados em larga escala por décadas, sendo considerados extremamente eficazes. No entanto, atualmente seu uso tornou-se inviável em razão da alta toxicidade dessas substâncias (Chigondo & Chigondo, 2016; Moraes *et al.*, 2018). O uso de inibidores derivados de cromato, por exemplo, foi proibido na União Europeia em 2007, devido à manifestação de efeitos cancerígenos em trabalhadores envolvidos na produção destes compostos (Costa & Klein 2006; Winkler *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2017).

Por sua vez, os IC orgânicos podem ser naturais ou sintéticos, sendo que a maioria destes compostos age por adsorção à interface metal-solução. São caracterizados pela presença de insaturações e/ou um grupo polar contendo nitrogênio, enxofre, selênio ou fósforo (Cardoso *et al.*, 2005; El-Maksoud, 2008; Cavallaro, 2018). Devido à sua alta capacidade de proteção e praticidade nos processos de síntese e aplicação, os IC de composição orgânica são os mais utilizados atualmente. Liderando quase 70% do mercado, com destacado uso de fosfatos, vanadatos e compostos do grupo benzotiazol, sobretudo o 2-mercaptobenzotiazol (MBT) (Cavallaro, 2018; Goyal *et al.*, 2018; Obot *et al.*, 2019).

A concorrência global e as restrições ambientais são fatores que influenciam diretamente o mercado de inibidores de corrosão, logo, o desenvolvimento de produtos inovadores é uma demanda constante, visando oferecer ao mercado alternativas eficazes, não-tóxicas e biodegradáveis (Martins *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2018; Obot *et al.*, 2019). À vista disso, o encapsulamento destes compostos ativos em nanomateriais manufaturados (NM) apresenta-se como uma inovação tecnológica promissora, que visa a otimização de seu uso e redução de impactos ambientais associados (Zheludkevich *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2012; Rahimi & Amiri, 2016; Martins *et al.*, 2017; Kuznetsova *et al.*, 2017). Esta estratégia baseia-se no mecanismo de liberação controlada dos compostos encapsulados em NM, que ocorre de maneira gradual e através de estímulos ambientais. Dessa forma, apenas fatores como mudanças de pH, presença de cloretos e a degradação de revestimentos ocasionarão a atuação

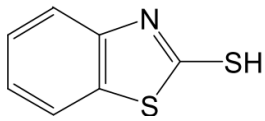
dos compostos inibidores de corrosão, otimizando seu uso e a durabilidade do sistema anticorrosivo (Martins *et al.*, 2017).

Assim, o nanoencapsulamento de IC amplamente utilizados, como o 2-mercaptobenzotiazol, torna-se uma possibilidade promissora, de modo a aprimorar sua eficácia, reduzir seu uso na forma bruta e consequentemente, sua toxicidade e os eventuais riscos ecológicos associados (Kuznetsova *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2017). Para este fim, nanocápsulas mesoporosas de sílica (SiNC) e hidróxidos duplos lamelares (LDH) exibiram resultados viáveis quanto ao encapsulamento de agentes anticorrosivos (Zheludkevich *et al.*, 2010; Saremi & Yeganeh, 2014; Tedim *et al.*, 2011, 2012; Maia *et al.*, 2012; Serdechnova *et al.*, 2017).

1.1. 2-Mercaptobenzotiazol (MBT)

O 2-Mercaptobenzotiazol é um composto aromático heterocíclico que contém nitrogênio e enxofre em sua formulação ($C_7H_5NS_2$), como é apresentado na **Tabela 1**. Este composto é insolúvel em água, entretanto, apresenta solubilidade em solventes orgânicos como etanol, éter dietílico e ácido acético, além de soluções alcalinas ou orgânicas contendo bases de amina (Wu *et al.*, 2012).

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

Composto químico	2-Mercaptobenzotiazol
Estrutura química	
Fórmula química	$C_7H_5NS_2$
Peso molecular	167,25

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

Este composto orgânico apresenta ampla versatilidade e baixo custo de produção, tornando-se interessante para uma variedade de aplicações químicas e industriais. Chipinda *et al.* (2007) estimaram uma produção anual de aproximadamente 40.000 toneladas de MBT no

início dos anos 2000 na Europa, considerando que seus principais usos se referem à vulcanização de produtos de borracha e a inibição do processo corrosivo em metais.

Devido à sua composição química, o uso de MBT facilita a formação de complexos hidrofóbicos que atuam como uma barreira contra o ambiente corrosivo (Rani & Basu, 2012; Wu *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2006). Este aditivo apresenta-se como um bom candidato para a substituição dos compostos de cromato devido ao seu notável desempenho em meios ácidos, tornando-se apto para utilização em diversos metais, como ferro, cobalto, níquel, e especialmente cobre (Ohsawa & Suëtaka, 1979; Wu *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020). Todavia, além da capacidade anticorrosiva, impactos ambientais referentes ao seu uso e descarte também devem ser considerados, tendo em vista a sua aplicação em larga escala (Sanyal, 1981).

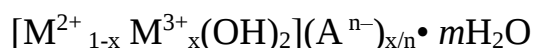
O uso de MBT tem sido comum em tintas marinhas e sistemas de recirculação de água, ocasionando, portanto, o seu descarte em ecossistemas aquáticos (Martins *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012). Jungclaus *et al.* (1976), por exemplo, verificaram 0,03 mg L⁻¹ de MBT em águas de escoamento urbanas, assim como Wever *et al.* (1997), que constatarem 150 mg L⁻¹ deste composto em águas residuais. Liao *et al.* (2018), Vogt (1988), Reemtsma *et al.* (1995), Fiehn *et al.* (1994), Kloepper *et al.* (2005) e Remberger *et al.* (2006) também verificaram sua presença em corpos d'água, sedimentos e efluentes municipais, evidenciando a necessidade de delimitar faixas de concentrações seguras para o seu uso.

1.2. Hidróxidos Duplos Lamelares

Os hidróxidos duplos lamelares (LDHs, do inglês "*Layered Double Hydroxides*") são sólidos lamelares, constituídos de camadas semelhantes à brucita¹, carregadas positivamente, entre as quais espécies aniônicas e moléculas de água são alternadas em galerias interlamelares de hidróxidos metálicos mistos (Evans & Slade, 2005; Tedim *et al.*, 2010). Podem ser sintéticos ou naturais e são comumente designados como "nanoargilas aniônicas", uma vez que apresentam entre 20 e 40 nm (Crepaldi & Valim 1998; Monteiro, 2009; Tedim *et al.*, 2010). O balanço de carga é mantido neutro por ânions, orgânicos ou inorgânicos, no domínio interlamelar, uma vez que materiais deste tipo exibem propriedades de troca aniônica

¹ Brucita é um mineral constituído de hidróxido de magnésio (Mg(OH)₂) que adquire forma escalenoédrica hexagonal.

e sorção (Rajamathi *et al.*, 2001). A maioria dos hidróxidos duplos lamelares pode ser representada pela fórmula:



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

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

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

Hidróxidos Duplos Lamelares podem ser facilmente sintetizados em laboratório através da co-precipitação, e, devido à sua eficiente propriedade de troca iônica, podem ser utilizados contra íons agressivos, como os cloretos. Esta propriedade vinculada ao uso de inibidores de corrosão no seu domínio interlamelar, oferece uma dupla proteção contra ambientes corrosivos (Sun *et al.*, 2015; Deip, 2017). Outros usos estão associados a aplicações farmacêuticas, cosméticas, catalíticas e adsorventes (Crepaldi & Valim 1998; Evans & Duan, 2006; Monteiro, 2009). MgAl-LDH, por exemplo, é comumente utilizado como nano-transportador de fármacos, liberando compostos de forma controlada e em sítios específicos do organismo (Choy *et al.*, 2001; Mohanambe & Vasudevan, 2005; Pálinkó, 2006). Estudou-se também a intercalação de ácido ascórbico (vitamina C) em ZnAl-LDH, devido ao seu elevado potencial de estabilização, apresentando resultados promissores na penetração de vitamina C na pele e atuando paralelamente na absorção de óleos e suor (Yang *et al.*, 2003).

No que diz respeito à prevenção da corrosão em superfícies metálicas, a aplicação de compostos ativos, orgânicos e inorgânicos, assim como nanomateriais associados, possibilita a sua liberação para o meio e consequente interação com receptores biológicos. Dessa forma, uma vez que a adoção destas tecnologias deverá acarretar no descarte de novas substâncias em ambientes aquáticos, avaliações sobre os seus efeitos adversos à biota se fazem necessárias, de modo a determinar seu potencial ecotoxicológico e contribuir para o controle e proteção destes ecossistemas (Daley & Hodge, 2010).

1.3. Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é uma ciência que fornece subsídios para a integração de informações ambientais, dando significado biológico a dados físico-químicos a partir da mensuração dos efeitos nocivos de certas substâncias sobre organismos vivos (Zagatto & Bertolotti, 2008; Perina, 2009). Nessa perspectiva, a realização de ensaios ecotoxicológicos ocorre sob condições controladas, seguindo metodologias padronizadas, estabelecidas nacional e internacionalmente para organismos-teste previamente selecionados (Perina, 2009). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), a *International Organization for Standardization* (ISO) e outras associações definem protocolos para a caracterização de efeitos adversos causados por uma determinada substância, mistura de substâncias ou amostra ambiental sob determinado (Zagatto & Bertolotti, 2008).

Os testes de toxicidade aquática são delineados para descrever uma relação dose-resposta, uma vez que a resposta dos organismos vivos à exposição de agentes tóxicos depende da sua dose (nível de exposição, que envolve tempo e concentração). Os testes de toxicidade aguda geralmente são projetados para avaliar a relação concentração-resposta para a sobrevivência (Hoffman *et al.*, 2002; Wright & Welbourn, 2002). No ambiente aquático, entretanto, devido a fatores de diluição, em geral, os organismos estão mais frequentemente expostos a níveis subletais dos poluentes. Esta exposição pode não levar à morte do organismo, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo. Além disso, a exposição crônica ou de longo prazo pode reduzir ou remover lentamente o número de indivíduos dentro de uma espécie, provocando efeitos a nível de população ou comunidade, respectivamente (Zagatto & Bertolotti, 2008; Férard & Blaise, 2013).

Efeitos subletais geralmente não são detectados em testes de toxicidade aguda, sendo necessária a realização de testes de toxicidade crônica, os quais são projetados para fornecer uma estimativa da concentração que não produz efeitos letais. Ensaios crônicos geralmente abrangem parte do ciclo de vida ou estágios iniciais de vida dos organismos-teste (*i.e.*, testes de desenvolvimento embriolarval), permitindo avaliar os efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos, como crescimento, reprodução, comportamento ou efeitos bioquímicos (Wright & Welbourn, 2002; Zagatto & Bertolotti, 2008).

1.3.1. Organismos-teste

A seleção dos organismos-teste segue as premissas estabelecidas para a realização de ensaios ecotoxicológicos: disponibilidade e conhecimento prévio da biologia da espécie, bem como sua sensibilidade a contaminantes (Zagatto & Bertoletti, 2008). Além disso, prioriza-se o uso de organismos neotropicais marinhos e estuarinos, fazendo-se necessária a existência de protocolos de ensaio padronizados para espécie ou família selecionada. Para ensaios de toxicidade, são consideradas espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo, possibilitando a avaliação de efeitos tóxicos crônicos em laboratório.

1.3.1.1. *Echinometra lucunter*

Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758), pertencentes à família Echinometridae, são caracteristicamente bentônicos, habitando regiões tropicais e subtropicais (ABNT, 2012). Ovos e embriões de ouriços-do-mar e outros equinodermes são amplamente utilizados em ensaios de toxicidade crônica de curta duração, uma vez que a fertilização e o desenvolvimento larval são fases críticas para o crescimento do organismo, além de serem sensíveis para a detecção de poluentes em ambientes marinhos (Zagatto & Bertoletti, 2008).

1.3.1.2. *Nitokra* sp.

Nitokra sp. é um copépodo harpacticóide representativo do ambiente bentônico estuarino neotropical. Este microcrustáceo tolera salinidades que variam de 5 a 30, possuindo um ciclo de vida curto (3 a 4 semanas), como é apresentado na **Figura 1** (Lotufo & Abessa, 2000). Capaz de sobreviver e se reproduzir na ausência de sedimento, *Nitokra* sp. apresenta fáceis condições de cultivo em laboratório e sensibilidade amplamente relatada em literatura, tornando-se um organismo-teste promissor na utilização em testes ecotoxicológicos com sedimento total ou apenas água (Lotufo & Fleeger, 1997; Abessa e Lotufo, 2002; Artal, 2013).

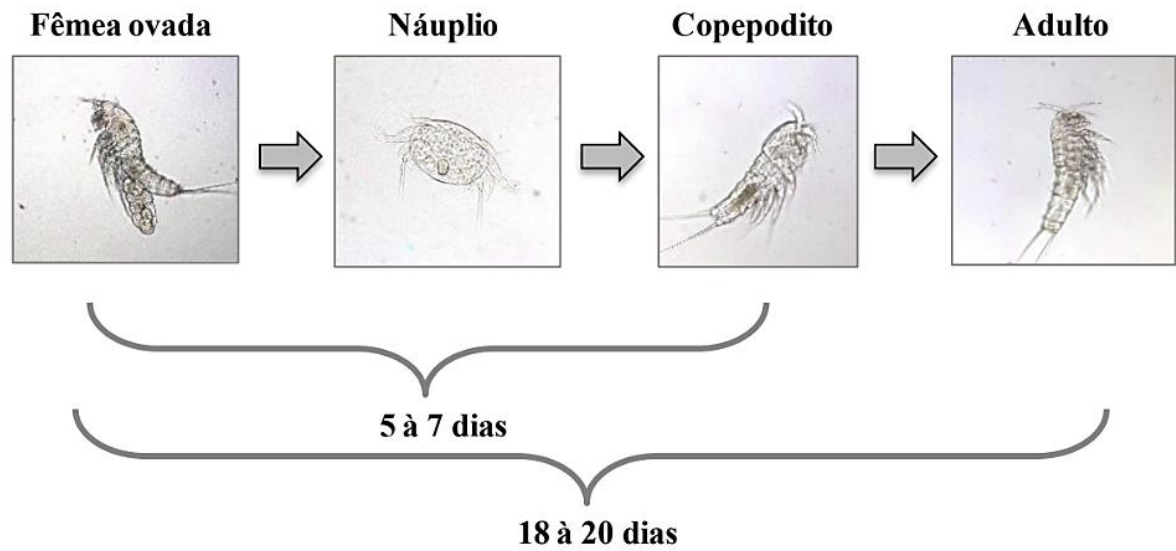


Figura 1. Ciclo de vida do copépodo bentônico *Nitokra* sp (extraído de Lotufo & Abessa, 2002).

2. Objetivos

A partir da hipótese de que imobilização de MBT em hidróxidos duplos lamelares reduz a toxicidade do composto ativo, o objetivo desta pesquisa é realizar uma avaliação da toxicidade crônica do anticorrosivo 2-mercaptobenzotiazol, em sua forma livre e nanoestruturada em hidróxidos duplos lamelares (LDH-NO₃), sobre organismos aquáticos de ambiente neotropical. Para tal, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* e fêmeas ovadas de *Nitokra* sp expostos ao (A) inibidor de corrosão MBT, (B) MBT imobilizado em LDH-NO₃ (MgAl LDH-MBT e ZnAl LDH-MBT) e dos (C) nanomateriais vazios (MgAl LDH e ZnAl LDH), de modo a avaliar a toxicidade das argilas aniônicas na ausência do inibidor de corrosão.

3. Materiais e Método

3.1. Ensaio crônico de curta duração com *Echinometra lucunter*

Para a determinação de alterações no desenvolvimento larval (ABNT, 2012) de MBT livre e imobilizado por LDH, foi realizada a coleta de organismos-teste em costões rochosos da praia do Guaiúba, localizada no município do Guarujá (SP). Foram coletados indivíduos adultos, os quais foram dispostos em uma caixa térmica sem água e transportados para o Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Campus do Litoral Paulista), onde ocorreu a aclimação em laboratório. O processo de aclimação foi realizado a partir da transferência dos organismos para um recipiente contendo água do mar reconstituída e forte aeração.

Primeiramente, os organismos foram previamente lavados com água de diluição, de modo a remover fezes e outros detritos da superfície corpórea. A liberação dos gametas foi induzida a partir de choque osmótico, provocado pela injeção de 2,5 mL de KCl 0,5 M na região perioral do ouriço em dois pontos diametralmente opostos, seguindo o procedimento preconizado na norma ABNT/NBR 15350 (ABNT, 2012). Tendo em vista que os ouriços-do-mar não apresentam dimorfismo sexual externo, a sexagem é feita pela coloração dos gametas liberados através dos gonóporos presentes na superfície aboral do ouriço.

Os óvulos foram coletados e sua viabilidade confirmada em microscópio óptico, a partir da verificação da membrana vitelínica. Os óvulos foram filtrados em malha de 150 µm, transferidos para um bquer de 1 L, homogeneizados e lavados três vezes (Nascimento *et al.*, 2002). O espermatozoide foi coletado e, posteriormente, foi preparada uma solução espermática constituída por 0,5mL de espermatozoide e 24,5 mL de água do mar filtrada. A fecundação ocorreu a partir da adição de 1 a 2 mL de solução espermática à solução de óvulos (100 mL). A viabilidade dos embriões foi verificada em microscópio, a partir da visualização da membrana de fertilização em no mínimo 80% dos ovos (Environment Canada, 1992). O cálculo da porcentagem de fecundação foi realizado a partir da média dos ovos contabilizados em três subamostras de 1 mL.

Cerca de 500 ovos recém-fecundados foram adicionados a tubos de ensaio contendo 10 mL de solução-teste. Os testes foram mantidos em câmara germinadora por um período de 36 a 42 horas, na temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (ABNT, 2020). Ao final, 0,5 mL de formaldeído tamponado foram adicionados a cada réplica, de modo a preservar os respectivos estágios

larvais. A leitura dos resultados consistiu na observação dos 100 primeiros embriões obtidos em subamostras de cada réplica, contabilizando os que apresentaram desenvolvimento normal (estágio *pluteus* típico), assim como as formas anômalas. Foram considerados anormais os estágios anteriores à larva *pluteus* (ovo, mórula, blástula e gástrula), os *pluteus* com atraso no desenvolvimento em relação ao controle, e os organismos deformados. Os óvulos eventualmente encontrados nas amostras não foram considerados, uma vez que não foram fecundados. No grupo controle, os embriões alcançaram a taxa de 80% de desenvolvimento normal, certificando a viabilidade do ensaio (ABNT, 2012; Environment Canada, 1992).

a) Sensibilidade do organismo-teste *Echinometra lucunter*

O surfactante aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (DSS), $C_{12}H_{25}NaO_4S$, foi utilizado como substância de referência nos ensaios de toxicidade crônica com embriões de *Echinometra lucunter*. O DSS apresenta ação rápida e toxicidade consistente, agindo dentro de uma faixa estreita de concentrações (Bonfim, 2005). Além disso, essa substância apresenta alta taxa de degradação (Environment Canada, 1990), corroborando o seu uso em ensaios de curta duração.

Os testes de sensibilidade foram executados em paralelo aos experimentos com MBT livre e nanoestruturado em hidróxidos duplos lamelares, utilizando-se o mesmo lote de organismos para ambos os ensaios. Os resultados foram expressos através da Concentração de Efeito para 50% dos organismos expostos (CE_{50}) e os limites de aceitabilidade dos resultados foram comparados com a média dos resultados (CE_{50}) dispostos na literatura para essa substância de referência.

3.2. Ensaio de fecundidade com *Nitokra* sp.

O ensaio de toxicidade crônica com *Nitokra* sp. seguiu a metodologia proposta por Lotufo & Abessa (2002) e padronizada pela norma NBR 16723:2021 (ABNT, 2021), desta maneira, foram avaliadas as alterações em sua taxa de fecundidade a partir da exposição às substâncias químicas em questão. Os copépodos foram selecionados a partir de dois cultivos mantidos no Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) e Universidade Santa Cecília (UNISANTA), ambos a 25 ± 2 °C e salinidade 17 ± 1 . Os organismos foram separados do cultivo por peneiramento, o qual foi realizado com uma malha de 0,12 mm. O material retido em malha foi transferido para uma placa de petri e examinado para a obtenção de cinco

fêmeas ovígeras para cada réplica (tubos de ensaio) contendo soluções-teste e o controle experimental, considerando-se 4 réplicas para cada concentração testada. Ressalta-se que, para cada substância testada, utilizou-se apenas um cultivo laboratorial, de modo a expor apenas um lote de organismos por ensaio.

Considerando o longo período de exposição, foi realizada a alimentação dos organismos-teste a partir da adição de 50 µL de levedura (fermento Fleischman) homogeneizada em água. Posteriormente, o experimento foi incubado por 7 dias (25 ± 2 °C) com fotoperíodo de 12h /12h (claro/escuro). Ao final deste período, o teste foi encerrado com a adição de 1 mL de formaldeído (4%) tamponado com borato de sódio e corante Rosa de Bengala (0,1%) em cada réplica. A taxa de fecundidade foi avaliada através da contagem de copepoditos e náuplios em microscópio óptico.

a) Sensibilidade do organismo-teste *Nitokra sp*

O composto inorgânico Sulfato de Zinco, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi utilizado como substância de referência em ensaios de toxicidade aguda com fêmeas ovadas de *Nitokra sp*. Nos casos em que os ensaios com a substância de referência não foram realizados concomitantemente aos experimentos definitivos com os nanomateriais e compostos anticorrosivos, o intervalo entre estes experimentos não excedeu 15 dias.

Os resultados obtidos para ambos os cultivos laboratoriais utilizados (NEPEA e UNISANTA) foram expressos através da Concentração Letal para 50% das fêmeas ovadas expostas por um período de 96 h (CL_{50}). Os limites de aceitabilidade dos resultados foram comparados com a média dos resultados (CL_{50}) dispostos na literatura para essa substância de referência.

3.3. Soluções-teste

Para o preparo das soluções-teste, utilizou-se água do mar reconstituída, a qual foi preparada com sal marinho *RedSea Salt* e filtrada em membranas de 0,45 e 0,22 µm, respectivamente. A salinidade foi ajustada a depender do organismo-teste, considerando 17 g L^{-1} de sal marinho para os ensaios com *Nitokra sp*. e 35 g L^{-1} para *Echinometra lucunter*.

Foram preparadas soluções-estoque com 2-mercaptobenzotiazol em sua forma livre (MBT), além do composto imobilizado em hidróxidos duplos lamelares (ZnAl LDH-MBT e MgAl LDH-BT). Ademais, para averiguar a toxicidade específica dos nanomateriais na ausência de MBT, foram preparadas soluções-estoque de LDH-NO₃ (ZnAl LDH e MgAl LDH). De modo a obter 100 mg L⁻¹ para as soluções-estoque, pesou-se 0,1 mg L⁻¹ de MBT, ZnAl LDH e MgAl LDH. A fim de utilizar concentrações equivalentes para todas as substâncias, considerou-se que apenas 25% do peso total de ZnAl LDH-MBT e MgAl LDH-BT correspondem ao inibidor de corrosão imobilizado. Portanto, para estes compostos, a massa utilizada foi calculada de acordo com o teor do anticorrosivo imobilizado no peso seco dos nanomateriais, ou seja, 0,4 mg/L.

As soluções-estoque foram dispostas em um banho ultrassônico (40kHz) por um período de 30 minutos, em virtude da baixa solubilidade destes compostos em água (Figueiredo *et al.*, 2019). Em seguida, realizou-se o processo de dispersão seriada para a preparação das soluções de exposição, imediatamente antes de cada ensaio ecotoxicológico. As soluções de exposição foram produzidas considerando um gradiente de concentrações (100; 33,3; 11,1; 3,70 e 1,23 mg L⁻¹) para a execução de ensaios preliminares. Os resultados obtidos auxiliaram na determinação de concentrações, em escala logarítmica, utilizadas nos testes definitivos: 0,015; 0,046; 0,137; 0,41; 1,23 e 3,7 mg L⁻¹, adotando-se o fator de diluição 3 (FT = 3).

3.3.1. Substâncias de referência

No que diz respeito ao ensaio de referência com Dodecil Sulfato de Sódio, realizado com os embriões de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*, as concentrações testadas foram 0,5; 1; 2; 3; 5 mg L⁻¹, considerando quatro réplicas e um controle negativo com água do mar reconstituída (salinidade 35). Para os copépodos do gênero *Nitokra* sp., o ensaio com substância de referência foi realizado a partir da exposição de cinco fêmeas ovadas em 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg L⁻¹ de Sulfato de Zinco, considerando quatro réplicas e um controle negativo com água do mar reconstituída (salinidade 17).

3.4. Garantia de qualidade dos ensaios de toxicidade

Para averiguar as condições adequadas para a realização dos experimentos, parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido) foram monitorados no início e fim de cada ensaio ecotoxicológico (**Apêndice A**).

3.5. Análise dos resultados

Os efeitos tóxicos são estimados estatisticamente através de índices de toxicidade, os quais expressam os resultados dos ensaios ecotoxicológicos de maneira quantitativa. A Concentração de Efeito Não Observado (CENO) é a maior concentração do agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre os organismos-teste, durante o tempo experimental de exposição, às condições do teste. A Concentração de Efeito Observado (CEO), por outro lado, é a menor concentração que provoca efeitos estatisticamente significativos. Assim, a princípio, os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias foram verificados através de testes estatísticos *Shapiro-Wilks* e *Bartlett*, respectivamente. Em seguida, os dados obtidos nos ensaios de toxicidade foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de *Dunnett* (nível de significância de 5%), ou equivalentes não paramétricos, visando comparar os resultados dos tratamentos com os respectivos controles e a determinação das Concentrações de Efeito Observável (CEO) e de Efeito Não Observável (CENO).

Por sua vez, a Concentração de Efeito para 50% da população (CE_{50}) é uma estimativa da concentração da substância utilizada que causa um efeito subletal a 50% dos organismos expostos, gerada graficamente através da curva derivada do conjunto de dados obtido a partir de todas as concentrações do teste, podendo ser estimada graficamente (Zagatto & Bertoletti, 2008). Já o cálculo das Concentrações de Efeito para 50% dos organismos (CE_{50}) foi realizado através de regressão não linear no software *GraphPad Prism 9*, com modelos apropriados que permitiram um ajuste quanto a soma dos quadrados e o valor de R^2 (ex. sigmoidal de 4 parâmetros).

Além disso, à título de comparação, executou-se a análise de variância multifatorial permutacional (PERMANOVA) no software *Past 4.0*, a qual foi realizada baseada no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, com 999 permutações, de modo a comparar os diferentes tratamentos nas concentrações testadas. À vista disso, comparações foram realizadas para os

resultados de MBT livre e nanoestruturado (ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT. Da mesma forma, os resultados dos hidróxidos duplo lamelares (ZnAl LDH e MgAl LDH) foram comparados entre si, considerando o nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1. Ensaio com substância de referência

O ensaio com substância de referência foi realizado com DSS, em paralelo aos experimentos definitivos com embriões de *Echinometra lucunter*, apresentando uma Concentração de Efeito para 50% da população de $0,938 \text{ mg L}^{-1}$, com intervalo de confiança (95%) de $0,512$ a $1,715 \text{ mg L}^{-1}$. Efeitos significativos com relação ao controle foram observados na menor concentração (CEO = $0,500 \text{ mg L}^{-1}$), sendo que a partir de 3 mg L^{-1} não foram verificadas larvas desenvolvidas no estágio pluteus (**Figura 2**).

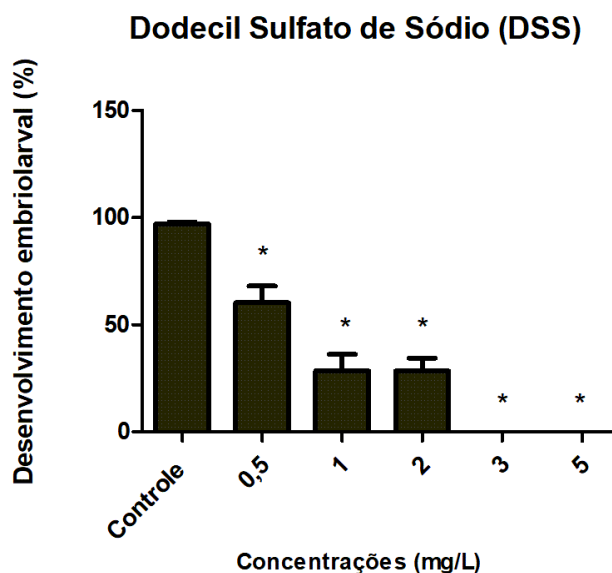


Figura 2. Sensibilidade dos embriões de *Echinometra lucunter* expostos a concentrações de Dodecil Sulfato de Sódio (substância de referência). (*) Efeito significativo com relação ao controle.

Os ensaios com a substância de referência Sulfato de Zinco foram realizados com ambos os lotes de organismos de *Nitokra* sp. utilizados nos experimentos do presente estudo (**Figura 3**). Ambos os cultivos indicaram efeitos tóxicos significativos apenas a partir de 10 mg L^{-1} (CEO), concentração da qual não foram contabilizadas fêmeas sobreviventes, assim como a 100 mg L^{-1} .

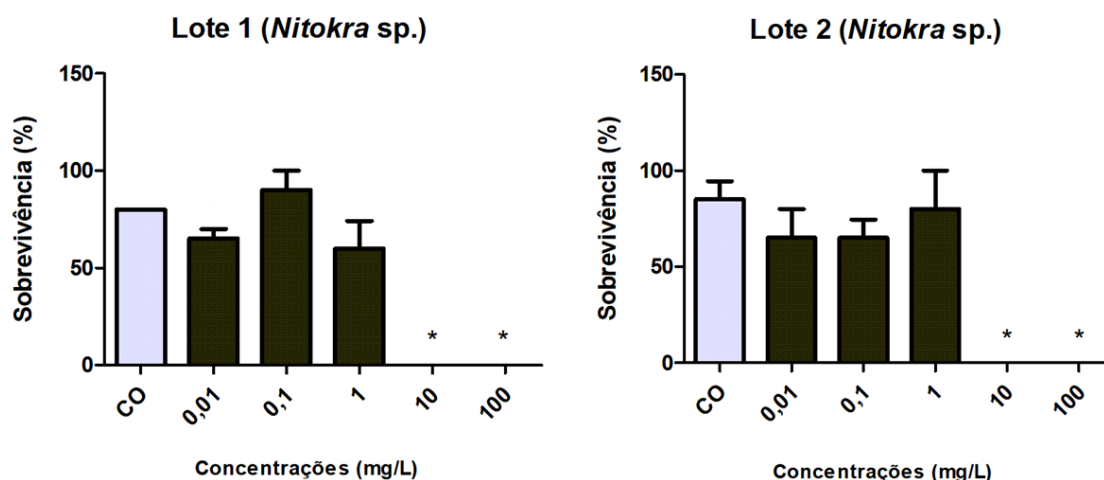


Figura 3. Resultados do ensaio agudo de sensibilidade com fêmeas ovadas do gênero *Nitokra* sp expostas a concentrações de Sulfato de Zinco (substância de referência). (*) Efeito significativo com relação ao controle.

Conforme indicado na Tabela 2, no que diz respeito a exposição à Sulfato de Zinco, o Lote 1 apresentou Concentração Letal para 50% da população a 1,69 (0.34 - 8.44) mg L⁻¹, enquanto o Lote 2 exibiu CL_{50-96h} = 0,65 (0.11 - 3.88) mg L⁻¹.

Tabela 2. Sensibilidade das fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. (lotes 1 e 2) expostas à substância de referência Sulfato de Zinco.

Substância	Lote de organismos	<i>Nitokra</i> sp. CL _{50-96h} (mg L ⁻¹)	Cultivo
Sulfato de zinco	1	1,69 (0.34 - 8.44)	NEPEA
	2	0,65 (0.11 - 3.88)	UNISANTA

Cabe mencionar que, para os experimentos realizados com MgAl LDH e ZnAl LDH MBT, utilizou-se o lote de organismos 1 (NEPEA), enquanto MBT, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH foram realizados com organismos do lote 2 (UNISANTA).

Os ensaios com substâncias de referência apresentaram resultados dentro da faixa de aceitabilidade para os organismos-testes. No que diz respeito a sensibilidade dos embriões de *Echinometra lucunter* para Dodecil Sulfato de Sódio, as concentrações de efeito reportadas na literatura variam entre CE_{50-36h} = 1,62 mg L⁻¹ e 3,00 mg L⁻¹, conforme descrito por Araújo *et al.* (1999), Pereira *et al.* (2010), Bomfim, (2005). Quanto aos copépodos (*Nitokra* sp.), ambos os lotes de organismos utilizados nos ensaios crônicos exibiram sensibilidade similar ao

Sulfato de Zinco, em consonância com os valores apresentados por Furley *et al.* (2010) e Artal *et al.* (2011) ($CL_{50-96h} = 3,3$ e $1,37 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente).

4.2. Ensaios com anticorrosivos e hidróxidos duplos lamelares

4.2.1. *Echinometra lucunter*

O desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* foi avaliado a partir da exposição dos embriões a hidróxidos duplos lamelares (ZnAl LDH e MgAl LDH), ao inibidor de corrosão MBT em sua forma livre e imobilizada (ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT) em concentrações de $0,015$ a $3,7 \text{ mg L}^{-1}$. As concentrações de Efeito Observado (CEO) e Concentrações de Efeito Não Observado (CENO), assim como as Concentrações de Efeito para 50% da população são apresentadas na **Tabela 3**.

No que se refere aos nanomateriais vazios, ZnAl LDH apresentou efeitos significativos com relação ao Controle ($p > 0,05$) desde a menor concentração testada (CEO = $0,015 \text{ mg L}^{-1}$), enquanto MgAl LDH não diferiu do controle no que diz respeito ao desenvolvimento embriolarval até $0,015 \text{ mg L}^{-1}$. A partir de $0,046 \text{ mg L}^{-1}$ (CEO), observou-se um número significativamente superior de larvas pluteus anômalas, as quais apresentaram redução no comprimento dos braços com relação ao corpo. Dessa forma, a Concentração de Efeito para 50% da população foi de $0,368$ ($0,131 - 1,026$) mg L^{-1} para MgAL LDH e $0,107$ ($0,037 - 0,305$) mg L^{-1} para ZnAl LDH.

Com relação ao inibidor de corrosão MBT, na sua forma livre, a concentração de $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ apresentou 50% de larvas anômalas, diferindo significativamente do controle desde a menor concentração. Cabe ressaltar que a partir de $1,23 \text{ mg L}^{-1}$, há uma redução no número de larvas observadas, com uma média de 7,5 entre as réplicas. Na concentração de $3,7 \text{ mg L}^{-1}$, nenhum embrião foi observado. Dentre as substâncias testadas, MBT livre apresentou o menor valor para CE_{50} , $0,020$ ($0,006 - 0,065$) mg L^{-1} , indicando maior toxicidade para *E. lucunter*. Já em relação às formas de MBT nanoestruturado, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT, ambos apresentaram valores similares de CE_{50} ($0,050$ ($0,029 - 0,105$) mg L^{-1} , e $0,054$ ($0,029 - 0,098$) mg L^{-1} , respectivamente) demonstrando menor toxicidade em comparação ao MBT em sua forma livre. Entretanto, destaca-se que efeitos crônicos relativos ao

desenvolvimento embrionário dos ouriços foram observados desde a menor concentração ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$) e nenhuma larva pluteus foi contabilizada a $3,7 \text{ mg L}^{-1}$, assim como observado para MBT livre (**Figura 4**).

Tabela 3. Resultados ecotoxicológicos dos ensaios de desenvolvimento embrionário com *Echinometra lucunter* (mg L^{-1}).

Substância	CEO	CENO	CE ₅₀ ($\pm$ IC - 95%)
MBT	0,015	-	0,020 (0,006 - 0,065)
MgAl LDH	0,046	0,015	0,368 (0,131 - 1,026)
MgAl LDH MBT	0,015	-	0,055 (0,029 - 0,105)
ZnAl LDH	0,015	-	0,107 (0,037 - 0,305)
ZnAl LDH MBT	0,015	-	0,054 (0,029 - 0,098)

(CEO) Concentrações de efeito observado; (CENO) Concentrações de efeito não observado (CENO); (CE₅₀) Concentrações efetivas a 50% dos organismos; (IC) intervalos de confiança a 95%.

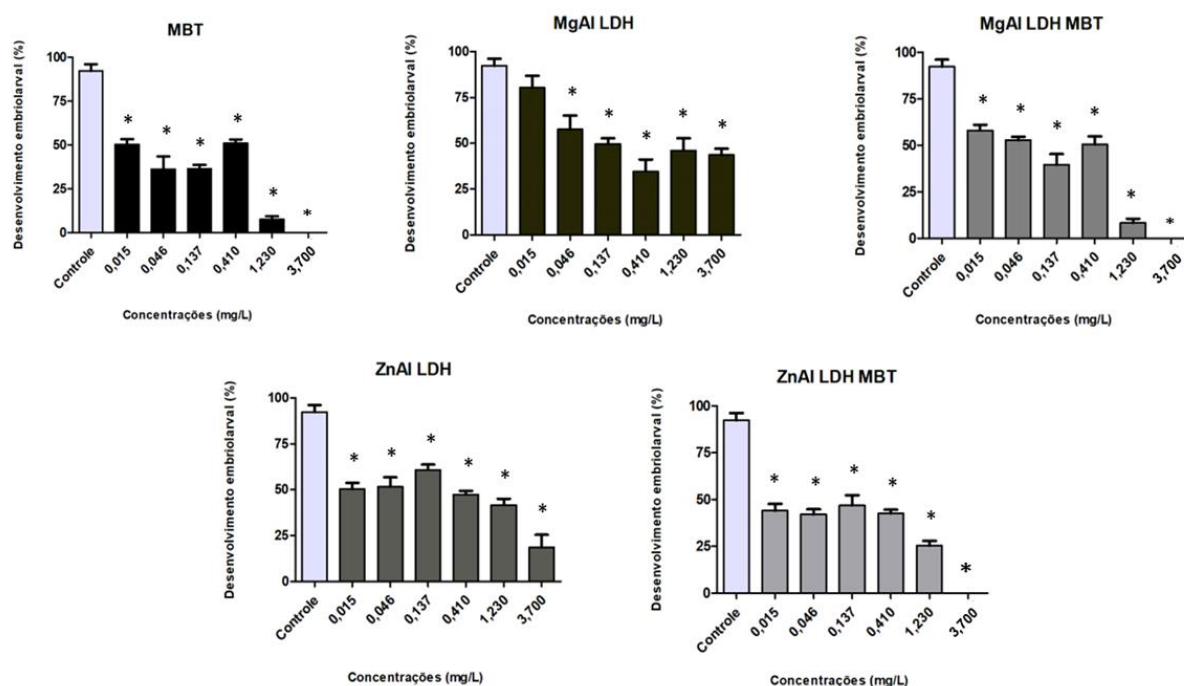


Figura 4. Desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* exposto a concentrações de hidróxidos duplos lamelares (MgAl LDH e ZnAl LDH), MBT livre e imobilizado (MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT). (*) Efeito significativo com relação ao controle.

Dessa forma, à título de comparação, a análise de permutações múltiplas (PERMANOVA) indicou que os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com MBT, ZnAl

LDH MBT e MgAl LDH MBT não apresentaram efeitos estatisticamente significativos entre as concentrações 0,015 e 0,41 mg L⁻¹ ($p > 0,05$). Portanto, para estas substâncias, apenas 1,23 e 3,7 mg L⁻¹ diferiram entre si e as demais concentrações ($p < 0,05$). A **Figura 5** corresponde a representação gráfica do desenvolvimento embriolarval de *E. lucunter* para MBT livre e nanoestruturado (ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT) em todas as concentrações testadas.

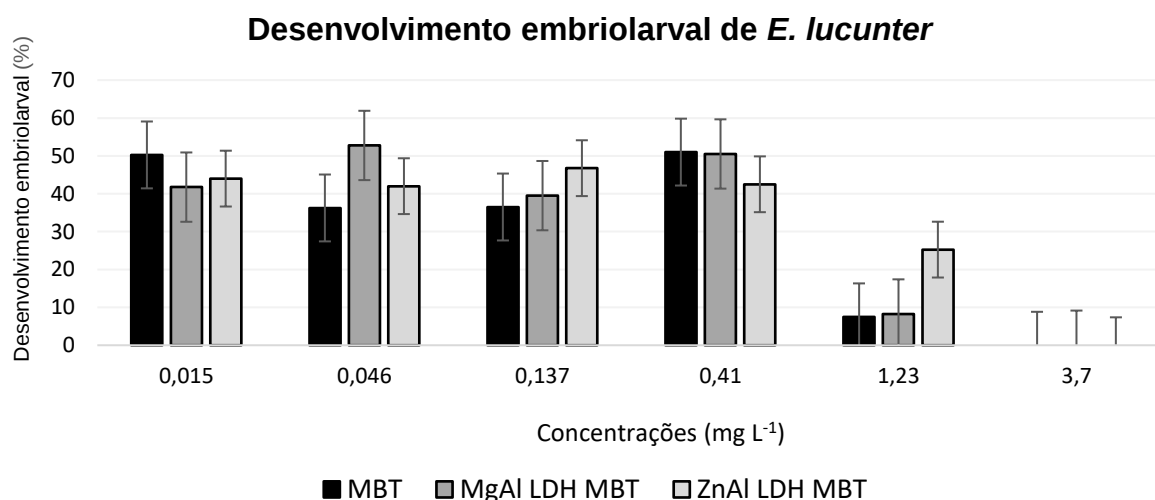


Figura 5. Comparação do desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* exposto a MBT, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT.

Com relação aos hidróxidos duplos lamelares, as concentrações 0,015 e 0,046 mg L⁻¹ não indicaram diferença estatísticas entre MgAl LDH e ZnAl LDH, enquanto as concentrações 0,137 e 0,41 mg L⁻¹ diferiram apenas de 0,015 e 3,7 mg L⁻¹. Têm-se também que 1,23 e 3,17 mg L⁻¹ apresentaram a mesma tendência para ambos os nanomateriais, não indicando diferenças significativas entre si ($p=0,054$), sendo que ambas indicaram menor toxicidade para ZnAl LDH. A **Figura 6** evidencia que ambas as concentrações apresentaram uma redução significativa na porcentagem de larvas desenvolvidas em ZnAl LDH, em comparação a MgAl LDH.

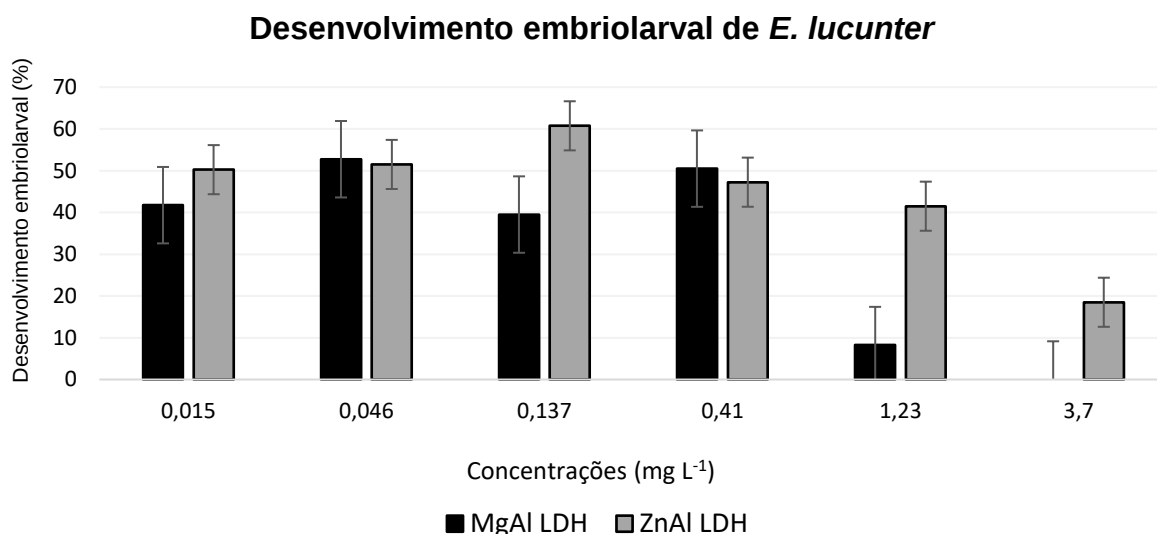


Figura 6. Comparação do desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter* exposto a MgAl LDH e ZnAl LDH.

4.2.2. *Nitokra* sp.

Testes preliminares com fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. foram realizados a partir de um gradiente de concentrações (1,23 – 100 mg L⁻¹). No que diz respeito ao anticorrosivo MBT livre e imobilizado em LDH, não foram observadas fêmeas ovadas, náuplios ou copepoditos nas concentrações testadas, indicando efeito agudo para os organismos expostos a concentrações $\geq 1,23$ mg L⁻¹, o que impossibilitou a análise estatística dos resultados e sua representação gráfica. Desta forma, a prole foi contabilizada apenas para os nanomateriais livres (ZnAl LDH e MgAl LDH) e o Controle (**Apêndice B**), permitindo a delimitação de concentrações mais diluídas para a avaliação da toxicidade das substâncias em questão.

Com relação aos experimentos definitivos, as análises de variância demonstraram que não houve diferença estatística entre o controle e as concentrações testadas de MgAl LDH ($p = 0,608$), ZnAl LDH ($p = 0,416$) e MgAl LDH MBT ($p = 0,553$). Ressalta-se, portanto, que os dados obtidos para estas substâncias não atenderam aos critérios estatísticos estabelecidos para o cálculo da Concentração de Efeito para 50% da população.

No que diz respeito ao MBT livre e ZnAl LDH MBT, os valores de CE₅₀ indicaram menor toxicidade para o inibidor de corrosão nanoestruturado em comparação à sua forma livre, conforme apresentado na **Tabela 4**. Cabe mencionar que valores obtidos para MBT (CE₅₀ = 0,227 mg L⁻¹), entretanto, apresentaram um elevado intervalo de confiança (0,002 –

18,410 mg L⁻¹) e R² = 0,391, enquanto ZnAl LDH MBT apresentou CE₅₀ = 0,519 (0,356 – 0,758) mg L⁻¹ e R² = 0,413. Além disso, os copépodos expostos à ZnAl LDH MBT não apresentaram efeitos significativos com relação ao Controle (p > 0,05) até a concentração de 1,23 mg L⁻¹ (CEO) (**Figura 7**).

Tabela 4. Resultados ecotoxicológicos do ensaio de fecundação com fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. (mg L⁻¹).

Substância	CEO	CENO	CE ₅₀ (± IC - 95%)
MBT	NC	-	0,227 (0,002 – 18,410)
MgAl LDH	NC	-	-
MgAl LDH MBT	NC	-	-
ZnAl LDH	NC	-	-
ZnAl LDH MBT	1,23	-	0,519 (0,356 – 0,758)

(CEO) Concentrações de efeito observado; (CENO) Concentrações de efeito não observado (CENO); (CE₅₀) Concentrações efetivas a 50% dos organismos; (IC) intervalos de confiança a 95%; (NC) Não Calculável.

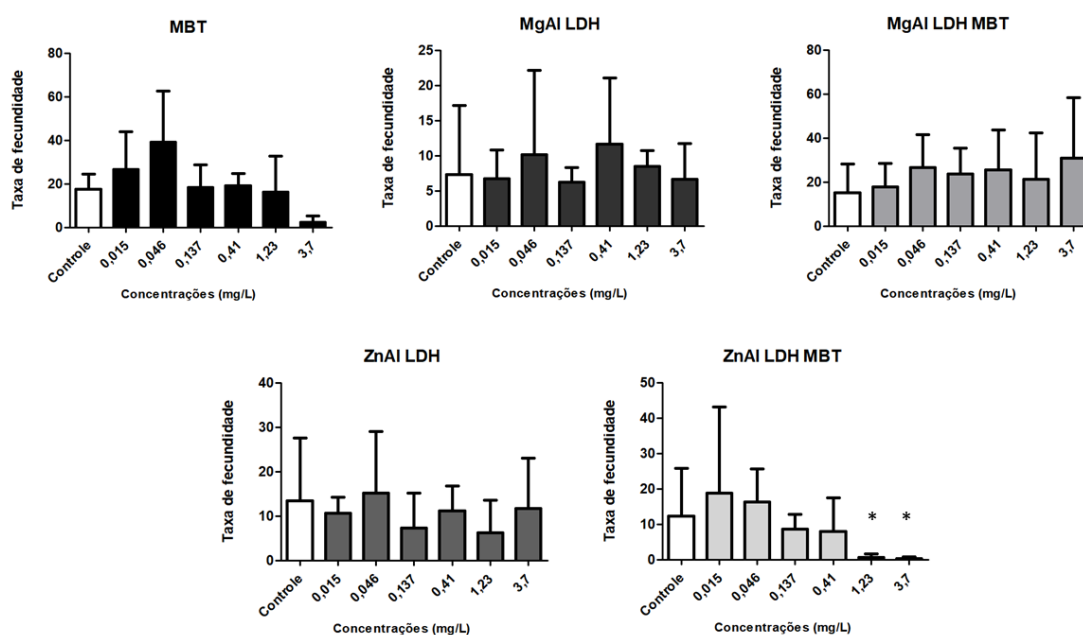


Figura 7. Resultados do teste de fecundidade com fêmeas ovadas do gênero *Nitokra* sp expostas à concentrações de hidróxidos duplos lamelares (MgAl LDH e ZnAl LDH), MBT livre e imobilizado (MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT). (*) Efeito significativo com relação ao controle.

Tendo em vista que o conjunto de dados obtidos para MgAl LDH MBT não atendeu os critérios para o cálculo da CE₅₀, a taxa de fecundidade (prole/fêmea) quantificada para MBT, ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT pode ser observada na **Figura 8**. De maneira geral, verifica-se uma menor taxa de fecundidade para ZnAl LDH MBT em comparação a

MBT e MgAl LDH MBT, mesma tendência observada para o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*. Ainda assim, análise de permutações indicou que para as concentrações 0,137 e 0,41 mg L⁻¹ não foram verificadas diferenças significativas entre essa substância, ZnAl LDH MBT e MBT livre. Os resultados da PERMANOVA também demonstraram que 0,015 mg L⁻¹ divergiu de 3,7 mg L⁻¹ (p=0,022), assim como 0,046 mg L⁻¹ apresentou diferenças significativas apenas com relação as duas maiores concentrações, sendo estas 1,23 mg L⁻¹ (p=0,027) e 3,7 mg L⁻¹ (p=0,024).

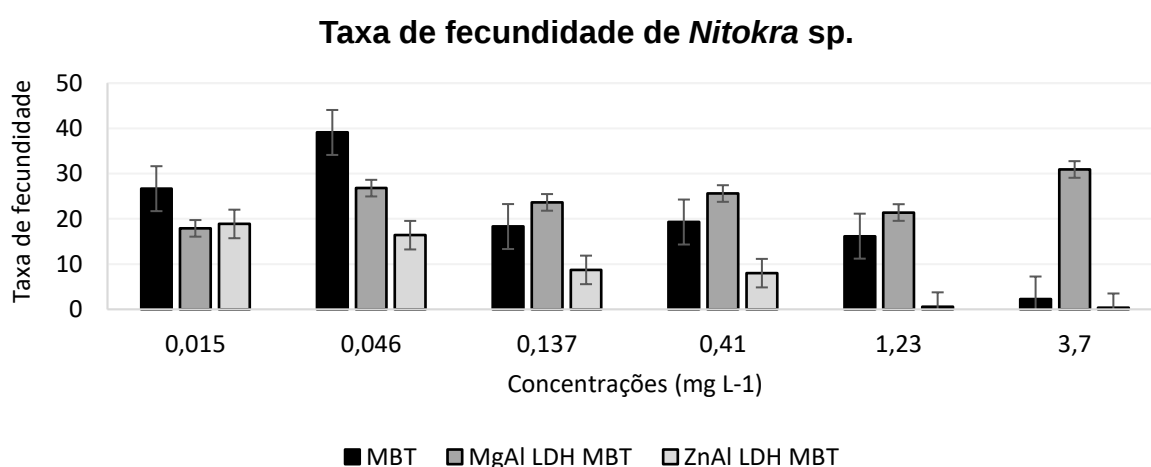


Figura 8. Comparação entre a taxa de fecundidade média de *Nitokra* sp. exposto a MBT, MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT.

Para os hidróxidos duplos lamelares, por sua vez, nenhuma concentração testada de ZnAl LDH e MgAl LDH apresentou efeitos tóxicos estatisticamente diferentes sobre a fecundação de *Nitokra* sp. (p=0,126). A **Figura 9** apresenta a comparação entre a taxa de fecundação observada para ambos os nanomateriais.

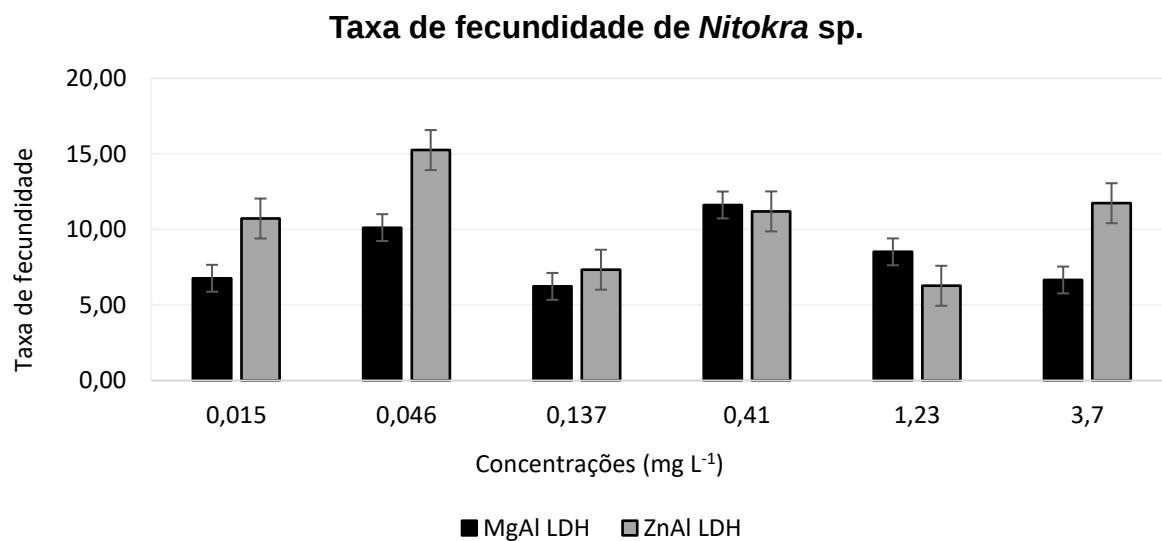


Figura 9. Comparação entre a taxa de fecundidade média de *Nitokra* sp. exposto a MgAl LDH e ZnAl LDH.

5. Discussão

Com relação aos experimentos realizados com *E. lucunter*, no âmbito da avaliação da toxicidade crônica de 2-mercaptobenzotiazol livre e nanoestruturado, nota-se que o inibidor de corrosão na forma livre apresentou resultados duas vezes mais tóxicos que MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT para os embriões de ouriço-do-mar, indicando que a nanomanufatura reduz a toxicidade de 2-mercaptobenzotiazol para este organismo. Em paralelo, a exposição aos hidróxidos duplos lamelares demonstraram que ZnAl LDH provocou efeitos mais acentuados sobre o desenvolvimento embriolarval deste organismo em comparação com MgAl LDH.

Avaliações a respeito da embriotoxicidade de nanomateriais sobre organismos aquáticos são escassas, com a maioria dos estudos voltados para peixes como *Danio rerio* e *Oryzias latipes* (Manabe et al., 2011; Brundo et al., 2016; Shaw et al., 2016; Percoraro et al., 2017; Priyam et al., 2022). Com relação a invertebrados, Fairbairn et al. (2011) avaliaram o efeito de nanomateriais de óxido metálico TiO_2 e CeO_2 em embriões e larvas de *Lytechinus pictus*, verificando a ausência de toxicidade até 10 mg L^{-1} . Por outro lado, os autores também realizaram a exposição crônica de nanomateriais de ZnO, a qual indicou elevado grau de toxicidade para os embriões ($\text{CE}_{50-96\text{h}} = 99,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Os efeitos observados referem-se ao desenvolvimento embriolarval retardado ou interrompido na fase de gástrula, exogastrulação e anormalidades esqueléticas. Os autores associaram a toxicidade de ZnO à sua solubilização e consequente liberação de Zn^{2+} no meio. Dessa forma, cabe mencionar que quantidades pequenas de cátions Zn^{2+} dissolvidos de Zn-Al LDH foram detectadas experimentalmente por Novell-Leruth et al. (2020). Apesar de seu elevado efeito protetor contra a corrosão, estudos com microalgas (Aruoja et al., 2009; Franklin et al., 2007; Miller et al., 2010), bactérias e crustáceos (Heinlaan et al., 2008) e peixes (Zhu et al., 2008) concluíram que os íons Zn solubilizados a partir de nanomateriais de óxido metálico ZnO desempenham um papel na toxicidade.

À vista disso, ressalta-se que a média observada para a fecundidade (fêmea/prole) de *Nitokra* sp. exposta à ZnAl LDH MBT também foi inferior a MgAl LDH MBT. Neste sentido, Bengtsson (1978) avaliou os efeitos agudos dos metais magnésio e zinco sobre *Nitocra spinipes* e os resultados corroboram a maior toxicidade de zinco ($\text{CL}_{50-96\text{h}} = 1,45 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação ao magnésio ($\text{CL}_{50-96\text{h}} = 720 \text{ mg L}^{-1}$). De acordo com Linden et al., 1979;

Ytreberg *et al.*, 2010, efeitos agudos de zinco para este organismo-teste variaram entre 0,89 e 4,3 mg L⁻¹. A respeito da toxicidade crônica, Artal *et al.* (2019) verificaram efeitos sobre a fecundidade das fêmeas ovadas a CE₁₀ = 0,020 mg L⁻¹ atribuindo a elevada toxicidade à biodisponibilidade dos íons metálicos em salinidade 17. De acordo com Hall & Anderson (1995), a toxicidade de metais tende a aumentar com a redução da salinidade, sendo este, portanto, outro fator a ser considerado sobre os efeitos crônicos observados para ZnAl LDH MBT (CL₅₀ = 0,5198 mg L⁻¹) no caso de liberação de íons Zn²⁺ durante o período crônico de exposição. Isso é especialmente importante ao comparar-se os resultados obtidos para *Nitokra* sp. com demais organismos, cujos experimentos foram conduzidos em salinidades acima de 30.

Não obstante, a exposição de fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. a ZnAl LDH MBT, apresentou uma curva dose-resposta bifásica, a qual caracterizou-se por respostas estimulatórias nas menores concentrações (0,015 e 0,046 mg L⁻¹) e efeitos inibitórios em concentrações mais elevadas (1,23 e 3,27 mg L⁻¹). Este resultado refere-se ao fenômeno hormese, amplamente investigado por Calabrese & Baldwin (1999, 2000; 2001; 2002; 2017). De acordo com os autores, *endpoints* crônicos como crescimento e fecundidade podem apresentar uma curva dose-resposta no formato de um U invertido, sugerindo que a ocorrência de efeitos benéficos estejam associados a processos compensatórios adaptativos, os quais são desencadeados a partir de uma perturbação inicial da homeostase nos organismos-teste. Chapman (2001) aponta que é possível obter, em baixas doses, resultados até 60% superiores ao Controle. Dessa forma, entende-se que a estimulação da fecundação dos copépodos em 0,015 e 0,046 mg L⁻¹ ZnAl LDH MBT seja uma resposta ao estresse acarretado pela exposição crônica a esta substância, excedendo a taxa de fecundidade apresentada pelo Controle. Efeitos horméticos foram observados em copépodos calanóides (*Eudiaptomus gracilis* e *Heterocope appendiculata*) por Santonja *et al.* (2017), a partir da exposição a substâncias húmicas. Da mesma forma, o copépodo dulcícola *Bryocamptus zschokkei* apresentou efeitos estimulatórios sobre a sua reprodução no que diz respeito a baixas concentrações do pesticida lindano (Brown *et al.*, 2003). *Nitokra spinipes* apresentou a mesma tendência para o metal cobre (Perez-Landa & Simpson, 2011).

Dessa forma, verifica-se que, apesar do potencial ecotóxico associado a liberação de íons metálicos, a imobilização de 2-mercaptobenzotiazol em nanoargilas acarretou a redução da toxicidade crônica para os embriões de *E. lucunter* e fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. Além

disso, zinco e magnésio referem-se a elementos essenciais para a maioria dos organismos aquáticos. De acordo com Mitra *et al.* (2012) e Cogun *et al.* (2005), por exemplo, zinco desempenha papéis fundamentais no crescimento, metabolismo celular e sobrevivência de crustáceos, atuando em processos enzimáticos e respiratórios. Dessa forma, ressalta-se ainda que a exposição em baixas concentrações pode provocar efeitos estimulatórios, como observado para *Nitokra* sp. com relação à ZnAl LDH MBT.

Cabe mencionar a necessidade de novos estudos para averiguar qual hidróxido duplo lamelar demonstra melhor desempenho ambiental com relação a toxicidade crônica para organismos aquáticos. No presente trabalho, ZnAl LDH, indicou maior toxicidade para embriões de *E. lucunter*, em relação a MgAl LDH, entretanto verificou-se o mesmo resultado para ambas as formas contendo o anticorrosivo MBT ($CE_{50} = 0,05 \text{ mg L}^{-1}$). Com relação as fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. não se observaram variação significativa entre as concentrações testadas para ambos os NM. Com relação a MgAl LDH MBT e ZnAl LDH MBT, entretanto, têm-se maior taxa de fecundidade para as fêmeas expostas as nanoargilas com Mg e Al.

No que se refere a 2-mercaptobenzotiazol, a toxicidade deste inibidor de corrosão para organismos aquáticos também é pouco discutida na literatura. Os principais estudos sobre os efeitos tóxicos deste composto são voltados para aves e roedores, com dados limitados sobre organismos aquáticos como bactérias, algas, crustáceos e peixes (Whittaker *et al.*, 2004; Nawrocki *et al.*, 2005; Remberger *et al.*, 2006; U.S. EPA, 2006; ECHA, 2008; Ginsberg *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2016). De maneira geral, efeitos crônicos como citotoxicidade e estresse oxidativo foram reportados para a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Zeng *et al.* 2016; Chibwe *et al.*, 2022). Nawrocki *et al.* (2005) avaliou a toxicidade do MBT para o microcrustáceo dulcícola *Ceriodaphnia dubia* foi avaliada em ensaios agudos (48 h) e crônicos (7 dias), com valores de $CE_{50} = 4,19$ e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Bivalves da espécie *Ruditapes philippinarum* também apresentaram efeitos fisiológicos a partir da exposição crônica deste composto, como a inibição significativa da acetilcolinesterase ($CE_{50} = 74,49 \text{ mg L}^{-1}$), indicando o potencial neurotóxico de MBT (Martins *et al.*, 2017). Neste mesmo estudo, Martins *et al.* (2017) também atestou menor toxicidade para LDH-MBT e LDH com relação aos mesmos efeitos, os quais apresentaram $CE_{50} = 91,09$ e $97,92 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Efeitos agudos do MBT também foram estimados por Milanova *et al.* (2001) estimaram sua Concentração Letal média (CL₅₀) para a truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*), a qual indicou maior toxicidade em água reconstituída (1,3 mg L⁻¹), enquanto os ensaios realizados com água doce natural indicaram CL₅₀ = 6,2 mg L⁻¹. Após um período de exposição de 96 h, Martins *et al.* (2017) verificaram que os bivalves expostos a concentrações iguais ou superiores a 0,1 mg L⁻¹ de MBT exibiram uma redução significativa na capacidade de sobrevivência ao ar (CL₅₀ = 22,1 mg L⁻¹), o que foi verificado para organismos expostos a LDH-MBT apenas a 100 mg L⁻¹ (CL₅₀ = 50,4 mg L⁻¹). A mesma tendência foi observada com relação a bioluminescência da bactéria *Allivibrio fischeri*, a qual foi significativamente inibida pela exposição a MBT e LDH-MBT, não havendo efeitos tóxicos associados à exposição de LDH, apenas (Kuznetsova *et al.*, 2017). No presente estudo, a taxa de desenvolvimento embriolarval observada para os ouriços-do-mar apresentou a mesma propensão, sendo os níveis de toxicidade: MBT > ZnAl LDH MBT > MgAl LDH MBT > Zn Al LDH > MgAl LDH, corroborando com a literatura. Além disso, é notável a maior sensibilidade exibida pelos embriões de *E. lucunter*, em comparação aos estudos supracitados, o que também pode ser atribuído ao estágio de vida dos organismos expostos às concentrações de MBT livre e nanoestruturado.

Martins *et al.* (2016) também realizaram estudos relativos à liberação de MBT dos hidróxidos duplos lamelares, reportando que 1/3 do anticorrosivo foi liberado nas primeiras horas de exposição. Os autores verificaram que, quando liberado no meio, este inibidor de corrosão pode se comportar de maneira semelhante a outros nanomateriais, reagindo e formando complexos químicos, além de apresentar potencial para ser absorvido e assimilado pelo sistema digestivo de organismos. Ding *et al.* (2018) testaram a toxicidade de LDH para algas verdes dulcícolas (*Scenedesmus quadricauda*), identificando a produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e inibição total do crescimento destes organismos em 50 mg L⁻¹ (CE_{50-72h}). Além do estresse oxidativo, os autores atribuíram o mecanismo de toxicidade dos nanomateriais à sua capacidade inerente de agregação e/ou aglomeração, sendo estes processos responsáveis pela redução da luminosidade disponível para as algas durante o período de exposição. Dessa forma, observou-se que as interações físicas entre as argilas aniônicas e o organismo-teste afetaram diretamente a sua capacidade fotossintética e absorção de nutrientes. Park *et al.* (2014) demonstraram que o aumento da salinidade está relacionado ao aumento da agregação e dissolução de nanomateriais, sendo este, portanto, um fator

possivelmente associado a sensibilidade exibida pelos embriões de ouriços-do-mar, expostos na salinidade 35. Além disso, ressalta-se que, assim como há liberação do anticorrosivo MBT a partir dos hidróxidos duplos lamelares, também pode haver liberação de íons metálicos Zn^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} , que compõem os nanomateriais, como citado anteriormente. Dessa forma, este fenômeno pode estar diretamente associado aos efeitos tóxicos observados, destacando a necessidade de novos estudos que contemplem essa variável.

Com relação a *Nitokra* sp., a exposição ocorreu em salinidade 17 e na presença de matéria orgânica, uma vez que a alimentação dos organismos é necessária devido ao caráter crônico do experimento (7 dias). Neste cenário, a agregação dos nanomateriais ocorre entre si e o alimento disponibilizado, aumentando sua sedimentação (Zhou *et al.*, 2016). Sugere-se, portanto, que tenha ocorrido a interação e, possivelmente, a ingestão destas substâncias por parte dos copépodos, organismos caracteristicamente bentônicos. A ingestão de nanomateriais por estes organismos foi reportada por Yi *et al.* (2019), onde efeitos tóxicos sobre a reprodução de *Tigriopus japonicus* foram parcialmente atribuídos à ingestão e fixação externa de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT, do inglês *Multi Wall Carbon Nanotubes*). Por outro lado, Zhou *et al.* (2016) propõem que a ingestão de nanopartículas de níquel por *Arcatia tonsa* possa ter interferido com a capacidade de ingestão de alimento, reduzindo a probabilidade de as fêmeas produzirem componentes vitelinos e embriões viáveis.

Michalec *et al.* (2017) destacam que a principal rota de assimilação de nanomateriais por *Eurytemora affinis* se dá da ingestão, uma vez que copépodes calanóides podem ingerir passivamente grandes quantidades de NM a partir de mecanismos de propulsão que criam correntes de alimento e permitem o arrasto e captura de presas. Os autores também pontuam a fixação externa como um fator determinante na toxicidade, tendo em vista que o acúmulo de NM em fêmeas ovígeras e seus apêndices pode representar uma redução de mobilidade, além dos mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta ao estresse. Ressalta-se que variações nas propriedades de natação podem atenuar as mudanças na alimentação, reprodução e fuga da predação (China & Holzman, 2014).

Devido à capacidade de sedimentação de aglomerados e/ou agregados, comunidades bentônicas podem ser diretamente afetadas pelo descarte destes nanomateriais em um cenário ambiental realista, atestando *Nitokra* sp. como um organismo-teste chave para a avaliação de

sua toxicidade. Além disso, em cadeias alimentares aquáticas, copépodos desempenham um papel ecológico crucial na transferência de energia do fitoplâncton para níveis tróficos superiores (Zhou *et al.*, 2022).

A produção e uso crescentes de nanomateriais inovadores corrobora a necessidade da identificação de suas propriedades, assim como avaliações a respeito de sua toxicidade para diversos organismos, em diferentes meios, abrangendo estágios de vida sensíveis, de modo a determinar efeitos crônicos sob a sua sobrevivência. Ressalta-se, portanto, a relevância em identificar as interações de nanomateriais em diferentes condições, auxiliando na previsão de seu destino e comportamento no meio aquático, assim como na elaboração de cenários de exposição e potencial ecotóxico (Rocha *et al.*, 2015).

6. Conclusão

Os resultados obtidos para o ouriço-do-mar *E. lucunter* demonstram o potencial tóxico das substâncias avaliadas no que diz respeito ao seu desenvolvimento embriolarval, indicando maior toxicidade para MBT livre e sugerindo que a sua imobilização em argilas aniônicas apresenta menor risco para este organismo. Ressalta-se, porém, que a análise de variância multifatorial permutacional não indicou diferenças significativas entre os efeitos tóxicos apresentados por estas substâncias entre as concentrações 0,015 e 0,046 mg L⁻¹. Além disso, foi observado que ZnAl LDH parece ser mais tóxico para este organismo-teste do que MgAl LDH.

Os experimentos realizados com de *Nitokra* sp. também demonstraram menor taxa de fecundidade para organismos expostos a MgAl LDH MBT, que não apresentou variância significativa entre as médias, em comparação ao ZnAl LDH MBT. A PERMANOVA, por sua vez, apontou que as concentrações 0,137 e 0,41 apresentaram a mesma tendência entre MBT livre e imobilizado em ambas as formas. Todavia, as concentrações efetivas para 50% da população demonstraram que MBT livre representa maior risco tóxico para os copépodos, no que diz respeito a reprodução. Assim como para MgAl LDH MBT, as análises de variância não indicaram diferença estatística para as nanoargilas ZnAl LDH e MgAl LDH, as quais também não divergiram entre si no que diz respeito à análise de permutações realizada para as concentrações testadas.

Os efeitos tóxicos observados para os compostos podem estar associados à capacidade de agregação dos nanomateriais e o anticorrosivo MBT, bem como a possível liberação de Zn²⁺ das argilas à base de ZnAl, sendo este um íon potencialmente tóxico para organismos aquáticos. Para os copépodos, possivelmente a exposição envolve também a ingestão destes materiais a partir de sua interação com a matéria orgânica, a qual aumenta aglomeração das nanopartículas e consequente sua sedimentação. Além disso, adesão de aglomerados aos apêndices e saco ovífero das fêmeas também pode ser um fator determinante na toxicidade para estes organismos.

Entre os organismos-teste, ressalta-se a maior sensibilidade exibida pelos embriões de *E. lucunter*, o que também pode ser atribuído ao estágio de vida dos organismos expostos às concentrações de MBT livre e nanoestruturado.

De maneira geral, a imobilização em nanomateriais demonstrou reduzir a toxicidade de MBT, conforme verificado pela indução de efeitos crônicos sobre embriões de *E. lucunter* e fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. Os resultados do presente estudo sugerem que a alternativa mais promissora é o uso de nanoargilas a base de magnésio e alumínio, no que se refere a redução da toxicidade crônica para organismos aquáticos de ambientes neotropicais.

7. Referências Bibliográficas

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2020). Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Norma ABNT NBR 15350:2020. 31 p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2021). Ecotoxicologia aquática — Método de ensaio com copépodos marinhos (Copepoda, Crustacea). Norma ABNT NBR 16723:2021. 32 p.
- Artal, M. C. Aplicação de teste de toxicidade com o copépodo marinho *Nitokra* sp. na avaliação de corantes: The use of the marine copepod-*Nitokra* sp. in the toxicity evaluation of dyes. (2013). 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1619648>. Acesso em: 01 jun. 2022.
- Artal, M. C., Santos, A., Dornelas, L. L., Vannuci-Silva, M., Vacchi, F. I., De Albuquerque, A. F., ... & Umbuzeiro, G. D. A. (2019). Toxicity responses for marine invertebrate species of brazilian occurrence. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 14(1), 15-25.
- Artal, M.A.; Albuquerque, A.F.; Lotufo, G.R.; Umbuzeiro, G.A. Influência da salinidade na dispersão do corante comercial Disperse Red 1 em testes de toxicidade aguda com o copépodo marinho *Nitokra* sp. In: *Congresso Brasileiro de Toxicologia*, 17, Ribeirão Preto-SP.
- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, 407(4), 1461-1468.
- Blaise, C., Gagne, F., Ferard, J.F. & Eullaffroy, P., 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, 23, 591–598.
- Bonfim, C. L. L. D. (2005). Efeitos do fenol e 4-clorofenol sobre o desenvolvimento embrionário de *Echinometra Lucunter* (Linnaeus, 1758): avaliação dessas substâncias como referência. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. p. 1-82.

- Brown, R. J., Rundle, S. D., Hutchinson, T. H., Williams, T. D., & Jones, M. B. (2003). A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic toxicology*, 63(1), 1-11.
- Brundo, M. V., Pecoraro, R., Marino, F., Salvaggio, A., Tibullo, D., Saccone, S., ... & Privitera, V. (2016). Toxicity evaluation of new engineered nanomaterials in zebrafish. *Frontiers in physiology*, 7, 130.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (1999). Reevaluation of the fundamental dose–Response relationship: A new database suggests that the U-shaped, rather than the sigmoidal, curve predominates. *BioScience*, 49(9), 725-732.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2001). The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicological Sciences*, 62(2), 330-338.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). Defining hormesis. *Human & experimental toxicology*, 21(2), 91-97.
- Calabrese, E. J., & Mattson, M. P. (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 3(1), 13.
- Calabrese, E.J. and L.A. Baldwin. 2001. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicol. Sci.* 62(2): 330–8.
- 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.
- Cavallaro, S. H. (2018). Avaliação do uso de um sulfossilanol como inibidor de corrosão para aço galvannealed. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo São Paulo. Universidade de São Paulo, 152 p.
- CEC (Commission of the European Communities). (1996). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, Environmental Risk Assessment. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg.

- Chapman, P. M. (2001). The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*, 20(10), 499-505.
- Chibwe, L., Parrott, J. L., Shires, K., Khan, H., Clarence, S., Lavalle, C., Sullivan, C., O'Brien, A. M., De Silva, A. O., Muir, D. C. G., & Rochman, C. M. (2022). A Deep Dive into the Complex Chemical Mixture and Toxicity of Tire Wear Particle Leachate in Fathead Minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(5), 1144–1153. <https://doi.org/10.1002/etc.5140>
- Chigondo, M. & Chigondo, F. (2016). Recent Natural Corrosion Inhibitors for Mild Steel: An Overview. *Journal of Chemistry*, 7.
- China, V., & Holzman, R. (2014). Hydrodynamic starvation in first-feeding larval fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8083–8088. doi:10.1073/pnas.1323205111
- Chipinda, I.; Hettick, J. M.; Simoyi, R. H.; Siegel, P. D. Oxidation of 2-Mercaptobenzothiazole in Latex Gloves and Its Possible Haptenation Pathway. **Chem. Res. Toxicol.** 2007, 20, 1084-1092.
- Choy, J.-H., Kwak, S.-Y., Park, J.-S., & Jeong, Y.-J. (2001). Cellular uptake behavior of [γ -³²P] labeled ATP-LDH nanohybrids. *Journal of Materials Chemistry*, 11(6), 1671–1674. doi:10.1039/b008680k
- Cogun, H., Yuzereroglu, T. A., Kargin, F. and Firat, O. 2005. Seasonal variation and tissue distribution of metals in shrimp and fish species from the Yumurtalik coast of Iskenderum Gulf, Mediterranean. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 75:707–715. doi: 10.1007/s00128-005-0809-6
- Costa, M., & Klein, C. B. (2006). Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(2), 155–163.
- Crepaldi, E. L. & Valim, J. B. (1998). Hidróxidos duplos lamelares: Síntese, estrutura, propriedades e aplicações. *Química Nova*, 21(3), 300–311. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000300011>

- Daley, R. R., & Hodges, S. A. (2010). Novel, environmentally friendly corrosion inhibitor. *Paint and Coatings Industry*, 26(4), 52–58.
- Deip, A. R. (2017). Estudo da eficiência de proteção contra a corrosão em aço AISI 1020 utilizado na indústria petroquímica empregando revestimentos inteligentes: incorporação de trocadores iônicos do tipo LDH-BTA em matriz epoxídica. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. 112 p.
- Ding, T., Lin, K., Chen, J., Hu, Q., Yang, B., Li, J., & Gan, J. (2018). Causes and mechanisms on the toxicity of layered double hydroxide (LDH) to green algae *Scenedesmus quadricauda*. *Science of the Total Environment*, 635, 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.222>
- El-Maksoud, S. A. A. (2008). The effect of organic compounds on the electrochemical behaviour of steel in acidic media. A review. *International Journal of Electrochemical Science*, 3(5), 528–555.
- Environment Canada. (1990). Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environment Canada, Environmental Protection, Conservation and Protection. Report EPS 1/RM12, August.
- Environment Canada. (1992). Biological test method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). Environment Canada, Environmental Protection, Conservation and Protection. Environmental Protection Series Report EPS 1/ RM/27, Ottawa, Canada.
- Evans, D. G. & Slade, R. C. T. (2005). Structural aspects of layered double hydroxides. *Structure and Bonding*, 119(December 2005), 1–87.
- Evans, D. G., & Duan, X. (2006). Preparation of layered double hydroxides and their applications as additives in polymers, as precursors to magnetic materials and in biology and medicine. *Chem. Commun.*, (5), 485–496. doi:10.1039/b510313b
- Fairbairn, E. A., Keller, A. A., Mädler, L., Zhou, D., Pokhrel, S., & Cherr, G. N. (2011). Metal oxide nanomaterials in seawater: Linking physicochemical characteristics with

- biological response in sea urchin development. *Journal of Hazardous Materials*, 192(3), 1565–1571. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.06.080
- Feng, Y., Chen, S., Zhang, H., Li, P., Wu, L. & Guo, W. (2006). Characterization of iron surface modified by 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayers. *Applied Surface Science*, 253(5), 2812–2819.
- Férard, J.-F., & Blaise, C. (Eds.). (2013). Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology. doi:10.1007/978-94-007-5704-2
- Fiehn, O., Reemtsma, T. & Jekel, M. (1994). Extraction and analysis of various benzothiazoles from industrial wastewater. *Analytica Chimica Acta*, 295(3), 297–305.
- Fleeger, J.W. & Lotufo, G.R. (1998). Development and application of a sublethal toxicity test to PAH using marine harpacticoid copepods: final report. OCS Study MMS 99-0001. U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, Louisiana. 38 pp.
- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., & Casey, P. S. (2007). Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental science & technology*, 41(24), 8484-8490.
- 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.
- Furley, T.H.; Vitali, M.M.; Sobreira, R.G.; Chagas, K.R.; Zaroni, L.P. (2010). Sensibilidade aguda do copépodo bentônico *Nitokra* sp ao sulfato de zinco em diferentes salinidades. In: *Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 11 p.
- Ginsberg, G., Toal, B. & Kurland, T. (2011). Benzothiazole toxicity assessment in support of synthetic turf field human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 74(17), 1175-1183.
- 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.

- Hall, L. W., & Anderson, R. D. (1995). The Influence of Salinity on the Toxicity of Various Classes of Chemicals to Aquatic Biota. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(4), 281–346. doi:10.3109/10408449509021613
- Handy, R. D., Cornelis, G., Fernandes, T., Tsyusko, O., Decho, A., Sabo-Attwood, T., Metcalfe, C., Steevens, J. A., Klaine, S. J., Koelmans, A. A., & Horne, N. (2012). Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1), 15–31. <https://doi.org/10.1002/etc.706>,
- Hauser-Davis, R. A., & Parente, T. E. (Eds.). (2018). *Ecotoxicology: Perspectives on Key Issues*. CRC Press.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., & Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), 1308-1316.
- Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr, G. A., & Cairns Jr, J. (Eds.). (2002). *Handbook of ecotoxicology*. CRC press.
- Jain, P., Patidar, B. & Bhawsar, J. (2020). Potential of Nanoparticles as a Corrosion Inhibitor: A Review. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 6(2), 1–12.
- Kelly, R. G., Scully, J. R., Shoesmith, D. W. & Buchheit, R. G. (2003). *Electrochemical Techniques in corrosion science and engineering*. Marcel Dekker, Inc, Estados Unidos da América.
- Kloepfer, A.; Jekel, M. & Reemtsma, T. (2005). Occurrence sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, 39, 3792-3798.
- Kurth, J. C., Krauss, P. D. & Foster, S. W. (2019). Corrosion Management of Maritime Infrastructure. *Transportation Research Record*, 2673(12), 2-14.
- Kuznetsova, A., Domingues, P. M., Silva, T., Almeida, A., Zheludkevich, M. L., Tedim, J., Ferreira, M. G. S. & Cunha, A. (2017). Antimicrobial activity of 2-

- mercaptobenzothiazole released from environmentally friendly nanostructured layered double hydroxides. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1207–1218;
- Liao, C., Kim, U. J. & Kannan, K. (2018). A Review of Environmental Occurrence, Fate, Exposure, and Toxicity of Benzothiazoles. *Environmental Science and Technology*, 52(9), 5007–5026.
- Linden, E., Bengtsson, B.-E., Svanberg, O., & Sundstrom, G. 1979. The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, 8(11–12), 843–851. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(79\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0045-6535(79)90015-8)
- Lotufo, G. R. & Abessa, D. M. S. (2002). Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I. A.; Sousa, E. C. P. M.; Nipper, M. (Eds.). *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. São Paulo, pp. 151-162.
- Lotufo, G. R., & Fleeger, J. W. (1997). Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 151, 91-102.
- Lotufo, G.R., Abessa, D.M.S. 2000. Uso de copépodos Bentônicos Estuarinos do Estado de São Paulo em Testes de Toxicidade com Sedimentos. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lotufo, G.R., Abessa, D.M.S. 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M, Nipper, M. (Org.) *Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil*. São Paulo: Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda., cap. 13.
- Ma, X., Xu, L., Wang, W., Lin, Z. & Li, X. (2017). Synthesis and characterisation of composite nanoparticles of mesoporous silica loaded with inhibitor for corrosion protection of Cu-Zn alloy. *Corrosion Science*, 120, 139–147.

- 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.
- Mainier, F. B., & Silva, R. R. (2010). As Formulações Inibidoras de Corrosão e o Meio Ambiente. *Engevista*, 6(3), 106-112.
- Martins, R., Oliveira, T., Santos, C., Kuznetsova, A., Ferreira, V., Avelelas, F., Caetano, A. P. F., Tedim, J., Ferreira, M., Freitas, R., Soares, A. M. V. M. & Loureiro, S. (2017). Effects of a novel anticorrosion engineered nanomaterial on the bivalve: *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Science: Nano*, 4(5), 1064–1076. <https://doi.org/10.1039/c6en00630b>
- Matranga, V., & Corsi, I. (2012). Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, 76, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.01.006>
- Michalec, F. G., Holzner, M., Barras, A., Lacoste, A. S., Brunet, L., Lee, J. S., ... & Souissi, S. (2017). Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod. *Environmental pollution*, 228, 102-110.
- Miller, R. J., Lenihan, H. S., Muller, E. B., Tseng, N., Hanna, S. K., & Keller, A. A. (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environmental science & technology*, 44(19), 7329-7334.
- Mitra, A., Barua, P., Zaman, S., & Banerjee, K. (2012). Analysis of trace metals in commercially important crustaceans collected from UNESCO protected world heritage site of Indian Sundarbans. *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 12(1), 53-66.
- Mohanambe, L., & Vasudevan, S. (2005). Anionic Clays Containing Anti-Inflammatory Drug Molecules: Comparison of Molecular Dynamics Simulation and Measurements. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(32), 15651–15658. doi:10.1021/jp050480m
- Monteiro, B. R. B. (2009) Argilas aniônicas multifuncionais. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro (Portugal). <http://hdl.handle.net/10773/3209>

- 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 Prospecção*, 11(5), 1579.
- Nascimento, I. A., de Sousa, E. C. P. M. & Nipper, M. G. (2002). *Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil*. Artes Gráficas e Indústria. 262 p.
- Nawrocki, S. T., Drake, K. D., Watson, C. F., Foster, G. D. & Maier, K. J. (2005) Comparative aquatic toxicity evaluation of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and selected degradation products using *Ceriodaphnia dubia*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48(3), 344-350.
- Nawrocki, S. T.; Drake, K. D.; Watson, C. F.; Foster, G. D.; Maier, K. J. Comparative Aquatic Toxicity Evaluation of 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole and Selected Degradation Products Using *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2005, 48, 344- 350
- Njuguna, J.; Pielichowski, K.; Zhu, (Ed.). Health and environmental safety of nanomaterials: polymer nanocomposites and other materials containing nanoparticles. Woodhead Publishing, 2021.
- Novell-Leruth, G., Pérez-Sánchez, G., Galvão, T. L. P., Boiba, D., Poznyak, S., Carneiro, J., ... Gomes, J. R. B. (2020). Unveiling the local structure of 2-mercaptobenzothiazole intercalated in (Zn₂Al) layered double hydroxides. *Applied Clay Science*, 198, 105842. doi:10.1016/j.clay.2020.105842
- Obot, I. B., Solomon, M. M., Umoren, S. A., Suleiman, R., Elanany, M., Alanazi, N. M. & Sorour, A. A. (2019). Progress in the development of sour corrosion inhibitors: Past, present, and future perspectives. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 79, 1–18.
- Ohsawa, M. & Suëtaka, W. (1979). Spectro-electrochemical studies of the corrosion inhibition of copper by mercaptobenzothiazole. *Corrosion Science*. 19, 709-722.
- Olajire, A. A. (2017). Corrosion inhibition of offshore oil and gas production facilities using organic compound inhibitors - A review. *Journal of Molecular Liquids*, 248, 775–808.

- Oliveira, I. M. (2017). Avaliação de inibidores de corrosão em meios agressivos que simulam os de produção de petróleo. Dissertação (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo, 158 p.
- Pálinkó, I. (2006). Organic-Inorganic Nanohybrids of Biologically Important Molecules and Layered Double Hydroxides. *Nanopages*, 1(3), 295–314. doi:10.1556/nano.1.2006.3.2
- Pecoraro, R., Salvaggio, A., Marino, F., Caro, G. D., Capparucci, F., Lombardo, B. M., ... & Brundo, M. V. (2017). Metallic nano-composite toxicity evaluation by zebrafish embryo toxicity test with identification of specific exposure biomarkers. *Current protocols in toxicology*, 74(1), 1-14.
- Perez-Landa, V., & Simpson, S. L. (2011). A short life-cycle test with the epibenthic copepod *Nitocra spinipes* for sediment toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(6), 1430–1439. doi:10.1002/etc.513
- Perina, F. C. (2009) Avaliação da toxicidade de biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes. 2009. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – Instituto de Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 121 f.
- Priyam, A., Singh, P. P., Afonso, L. O., & Schultz, A. G. (2022). Abiotic factors and aging alter the physicochemical characteristics and toxicity of Phosphorus nanomaterials to zebrafish embryos. *NanoImpact*, 25, 100387.
- Rahimi, A. & Amiri, S. (2016). Self-healing anticorrosion coating containing 2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptobenzimidazole nanocapsules. *Journal of Polymer Research*, 23(4).
- Raja, P. B., Ismail, M., Ghoreishiamiri, S., Mirza, J., Ismail, M. C., Kakooei, S. & Rahim, A. A. (2016). Reviews on Corrosion Inhibitors: A Short View. *Chemical Engineering Communications*, 203(9), 1145–1156.
- Rani, B. E. A. & Basu, B. B. J. (2012). Green inhibitors for corrosion protection of metals and alloys: An overview. *International Journal of Corrosion*, 2012, 15 p.

- Reemtsma, T., Fiehn, O., Kalnowski, G., & Jekel, M. (1995). Microbial Transformations and Biological Effects of Fungicide-Derived Benzothiazoles Determined in Industrial Wastewater. *Environmental Science and Technology*, 29(2), 478–485.
- Remberger, M., Woldegiorgis, A., Kaj, L., Andersson, J., Palm Cousins, A., Dusan, B., Ekheden, Y. & Brorström-Lundén, E. (2006). Results from the Swedish Screening 2005: Subreport 2. Biocides. (IVL Swedish Environmental Research Institute Ltda. Report B1700, 2006). Recuperado em 21 de maio, 2021: <http://www.ivl.se/download/18.343dc99d14e8bb0f58b74e8/1445515636254/B1700.pdf>
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., & Bebianno, M. J. (2015). Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. *Marine environmental research*, 111, 74-88.
- Rodríguez, D. M., Wrobel, K., Jiménez, M. G. G. & Wrobel, K. (2004). Determination of 2-mercaptobenzothiazole (MBT) in tannery wastewater by high performance liquid chromatography with amperometric detection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(5), 818–824.
- Santonja, M., Minguez, L., Gessner, M. O., & Sperfeld, E. (2017). Predator–prey interactions in a changing world: humic stress disrupts predator threat evasion in copepods. *Oecologia*, 183, 887-898.
- Sanyal, B. (1981). Organic Compounds as Corrosion Inhibitors in Different Environments - A Review. *Progress in Organic Coatings*, 9, 165–236.
- Saremi, M. & Yeganeh, M. (2014). Application of mesoporous silica nanocontainers as smart host of corrosion inhibitor in polypyrrole coatings. *Corrosion Science*, 86, 159–170.
- Serdechnova, M., Mohedano, M., Kuznetsov, B., Mendis, C. L., Strykevich, M., Karpushenkov, S., Tedim, J., Ferreira, M. G. S., Blawert, C. & Zheludkevich, M. L. (2017). PEO Coatings with Active Protection Based on In-Situ Formed LDH-Nanocontainers. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(2), C36–C45.

- Shaw, B. J., Liddle, C. C., Windeatt, K. M., & Handy, R. D. (2016). A critical evaluation of the fish early-life stage toxicity test for engineered nanomaterials: experimental modifications and recommendations. *Archives of toxicology*, 90(9), 2077-2107.
- Sun, X., Neuperger, E. & Dey, S. K. (2015). Insights into the synthesis of layered double hydroxide (LDH) nanoparticles: Part 1. Optimization and controlled synthesis of chloride-intercalated LDH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 459, 264–272.
- 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., Poznyak, S. K., Kuznetsova, A., Raps, D., Hack, T., Zheludkevich, M. L. & Ferreira, M. G. S. (2010). Enhancement of active corrosion protection via combination of inhibitor-loaded nanocontainers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(5), 1528–1535.
- 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.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). (2006). Reregistration Eligibility Decision for 2-(Thiocyanomethylthio)-benzothiazole (TCMTB). (21564-17-0 USEPA 738-R-05-003/agosto de 2006). Recuperado em 21 de maio, 2021: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/tcmtb_red.pdf
- Vogt, S.F. (1988) 2-Mercaptobenzothiazole; Final Test Rule. Federal Register 53 (173), September 7, 1988. Rules and regulations: 34514. Recuperado em 1 de junho, 2021: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/sun85.pdf>
- Whittaker, M.H., Gebhart, A.M., Miller, T.C. & Hammer, F. (2004). Human health risk assessment of 2- mercaptobenzothiazole in drinking water. *Toxicology and Industrial Health*. 20(6-10), 149-163.
- Wiener, M. S. & Salas, B. V. (2005). Corrosion of the marine infrastructure in polluted seaports. *Corrosion Engineering Science and Technology*, 40(2), 137–142.

- Winkler, D. A., Breedon, M., Hughes, A. E., Burden, F. R., Barnard, A. S., Harvey, T. G. & Cole, I. (2014). Towards chromate-free corrosion inhibitors: Structure-property models for organic alternatives. *Green Chemistry*, 16(6), 3349–3357.
- Wong, S. W., Leung, P. T., Djurišić, A. B., & Leung, K. M. (2010). Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(2), 609-618.
- Wright, D. A., & Welbourn, P. (2002). Environmental toxicology (Vol. 11). Cambridge University Press.
- 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.
- Yang, J. H., Lee, S. Y., Han, Y. S., Park, K. C., & Choy, J. H. (2003). Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule. *Bulletin of the korean chemical society*, 24(4), 499-503.
- Yi, X., Yu, M., Li, Z., Chi, T., Jing, S., Zhang, K., ... & Wu, M. (2019). Effect of multi-walled carbon nanotubes on the toxicity of triphenyltin to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 102, 789-794
- Ytreberg, E., Karlsson, J., & Eklund, B. 2010. Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Science of the Total Environment*, 408(12), 2459–2466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.036>
- Zagatto, P. A. (2008). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações (Vol. 478). E. Bertoletti (Ed.). São Carlos: RiMa.
- Zeng, F., Sherry, J.P. & Bols, N.C. (2016) Evaluating the toxic potential of benzothiazoles with the rainbow trout cell lines, RTgill-W1 and RTL-W1. *Chemosphere*, 155, 308-318.

- Zheludkevich, M. L., Poznyak, S. K., Rodrigues, L. M., Raps, D., Hack, T., Dick, L. F., Nunes, T. & Ferreira, M. G. S. (2010). Active protection coatings with layered double hydroxide nanocontainers of corrosion inhibitor. *Corrosion Science*, 52(2), 602–611.
- Zhou, C., Hou, J., & Lin, D. (2022). A ferritin gene in the marine copepod *Acartia tonsa* as a highly sensitive biomonitor for nano-contamination. *Aquatic Toxicology*, 253, 106353. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106353>
- Zhou, C., Vitiello, V., Casals, E., Puentes, V. F., Iamunno, F., Pellegrini, D., ... & Buttino, I. (2016). Toxicity of nickel in the marine calanoid copepod *Acartia tonsa*: Nickel chloride versus nanoparticles. *Aquatic toxicology*, 170, 1-12.
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., & Lang, Y. (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(3), 278-284.

Apêndice A

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Nitokra sp. *

MgAl LDH			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,015	5,92	7,48	18
0,046	6,02	7,50	18
0,137	6,07	7,51	18
0,41	6,16	7,52	18
1,23	6,10	7,49	17
3,7	6,00	7,50	17
Controle	6,48	7,39	18

ZnAl LDH MBT			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,015	5,79	7,78	17
0,046	5,76	6,83	17
0,137	5,83	8,26	17
0,41	5,84	8,06	17
1,23	5,91	6,83	17
3,7	5,89	8,26	17
Controle	6,03	8,08	19

MgAl LDH MBT			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,015	6,85	7,50	18
0,046	6,04	7,50	18
0,137	6,07	7,45	18
0,41	5,97	7,52	17
1,23	6,13	7,52	18
3,7	6,04	7,38	18
Controle	6,23	7,44	18

MBT			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,015	5,43	7,76	17
0,046	5,33	7,71	17
0,137	5,33	7,74	17
0,41	5,46	7,24	17
1,23	5,32	7,71	17
3,7	5,25	7,77	17
Controle	6,03	7,74	17

ZnAl LDH			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,015	5,56	7,77	17
0,046	5,52	7,75	17
0,137	5,66	7,73	17
0,41	5,58	7,63	17
1,23	5,49	7,74	17
3,7	5,54	7,77	17
Controle	5,38	7,73	17

ZnSO ₄			
Concentração	OD	pH	Salinidade
0,01	6,70	7,48	17
0,1	6,15	7,50	17
1	5,80	7,51	17
10	6,03	7,52	17
100	5,27	7,49	18
Controle	6,02	9,00	17

*média dos valores iniciais e finais

Echinometra lucunter

Parâmetros iniciais						
Concentração	OD		pH		Salinidade	
	[0,015]	[3,7]	[0,015]	[3,7]	[0,015]	[3,7]
MgAl LDH	7,02	7,0	7,53	7,5	35	35
MgAl LDH MBT	6,67	6,03	7,9	7,07	35	35
ZnAl LDH	6,83	6,77	7,84	7,61	35	35
ZnAl LDH MBT	6,71	6,12	6,7	7,12	35	35
MBT	6,02	6,57	7,86	6,39	35	35
Controle	7,77		6,35		35	

Parâmetros finais						
Concentração	OD		pH		Salinidade	
	[0,015]	[3,7]	[0,015]	[3,7]	[0,015]	[3,7]
MgAl LDH	6,72	6,93	7,42	7,96	35	35
MgAl LDH MBT	6,63	5,38	7,65	6,89	35	35
ZnAl LDH	6,7	6,7	7,47	7,09	35	35
ZnAl LDH MBT	6,29	6,16	6,79	6,91	35	35
MBT	5,91	6,1	7,84	6,02	35	35
Controle	7,77		6,35		35	

Apêndice B

DADOS COMPLEMENTARES

1. Ensaios preliminares

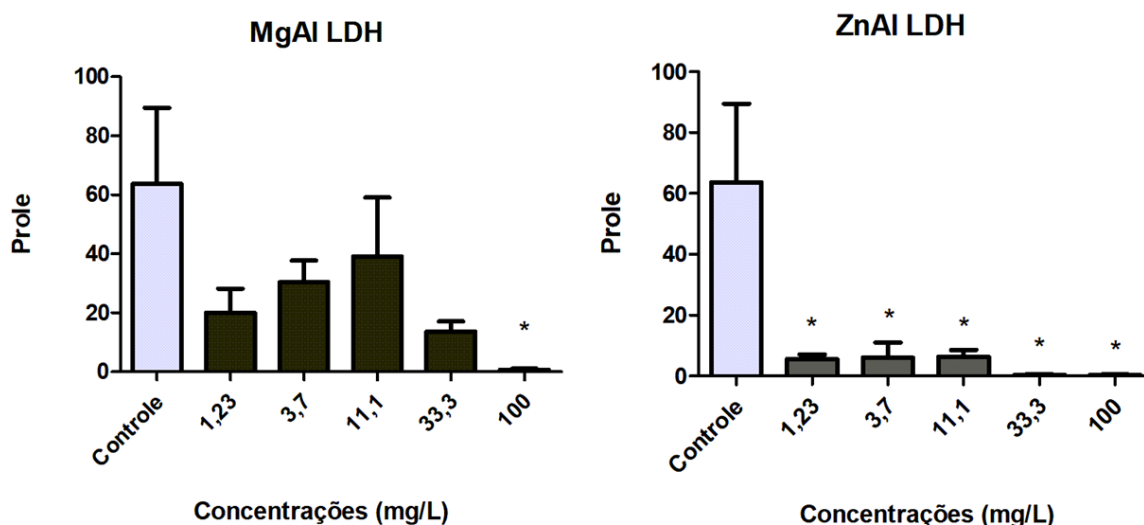


Figura 1. Resultados do ensaio preliminar realizado com fêmeas ovadas do gênero *Nitokra* sp., no qual foram contabilizados apenas náuplios e copepoditos, não sendo calculada a taxa de fecundidade para os compostos. Os resultados permitiram estabelecer concentrações mais diluídas para a execução dos ensaios definitivos.
(*) Efeito significativo com relação ao controle.

2. Análise de Variância Multifatorial Permutacional (PERMANOVA)

Tabela 1. Resultados da PERMANOVA para os ensaios ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* expostos à MBT, ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT. Células em destaque representam diferença estatística ($p = <0,05$) entre as concentrações.

MBT, ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT						
	0,015	0,046	0,137	0,41	1,23	3,7
0,015		0,0552	0,173	0,5505	0,03	0,0275
0,046	0,0552		0,2051	0,1469	0,0314	0,0303
0,137	0,173	0,2051		0,0589	0,03	0,0285
0,41	0,5505	0,1469	0,0589		0,0283	0,0264
1,23	0,03	0,0314	0,03	0,0283		0,0269
3,7	0,0275	0,0303	0,0285	0,0264	0,0269	

Tabela 2. Resultados da PERMANOVA para os ensaios ecotoxicológicos com embriões de *Echinometra lucunter* expostos à ZnAl LDH e MgAl LDH. Células em destaque representam diferença estatística ($p = <0,05$) entre as concentrações.

ZnAl LDH e MgAl LDH						
	0,015	0,046	0,137	0,41	1,23	3,7
0,015		0,0877	0,027	0,0267	0,0299	0,0288
0,046	0,0877		0,4265	0,0576	0,2268	0,0279
0,137	0,027	0,4265		0,0599	0,0889	0,0266
0,41	0,0267	0,0576	0,0599		0,2254	0,032
1,23	0,0299	0,2268	0,0889	0,2254		0,0547
3,7	0,0288	0,0279	0,0266	0,032	0,0547	

Tabela 3. Resultados da PERMANOVA para os ensaios crônicos com fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. expostas à MBT, ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT. Células em destaque representam diferença estatística ($p = <0,05$) entre as concentrações.

MBT, ZnAl LDH MBT e MgAl LDH MBT						
	0,015	0,046	0,137	0,41	1,23	3,7
0,015		0,6029	0,2825	0,2576	0,0859	0,0227
0,046	0,6029		0,0537	0,0557	0,0275	0,0242
0,137	0,2825	0,0537		0,8873	0,1462	0,0585
0,41	0,2576	0,0557	0,8873		0,2846	0,0555
1,23	0,0859	0,0275	0,1462	0,2846		0,2003
3,7	0,0227	0,0242	0,0585	0,0555	0,2003	

Tabela 4. Resultados da PERMANOVA para os ensaios crônicos com fêmeas ovadas de *Nitokra* sp. expostas à MBT, ZnAl LDH e MgAl LDH.

ZnAl LDH e MgAl LDH						
	0,015	0,046	0,137	0,41	1,23	3,7
0,015		0,3945	0,1716	0,3435	0,086	0,9154
0,046	0,3945		0,1155	0,7745	0,0854	0,6264
0,137	0,1716	0,1155		0,1399	0,3924	0,4826
0,41	0,3435	0,7745	0,1399		0,1144	0,4551
1,23	0,086	0,0854	0,3924	0,1144		0,2257
3,7	0,9154	0,6264	0,4826	0,4551	0,2257	