INTERCORR2008_272

Copyright 2008, ABRACO
Trabalho apresentado durante o INTERCORR 2008, em Recife/PE, no mês de maio de 2008.
As informações e opiniões contidas neste trabalho são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Avaliação da citotoxicidade do benzotriazol como inibidor de corrosão

S. O. Rogero [1], E. P. Banczek [2], I. Costa[3]

Abstract

Benzotriazol is a well known corrosion inhibitor of copper and its alloys and more recently it has been investigated for corrosion inhibition of stainless steels. There is much controversy, however, concerning its toxicity. According to security information of chemical products (FISPQ), benzotriazol shows toxic potential but the concentration related to toxicity has not been specified. Taking into consideration the concern on the environment and the known effectiveness of this compound in the corrosion inhibition of various metallic materials the aim of the present work was to evaluate the concentrations of benzotriazol at which it shows cytotoxicity. Cytotoxicity tests were carried out using concentrations of this compound in the range of 10^{-1} mol dm^{-3} e 10^{-5} mol dm^{-3}. The benzotriazol was diluted in culture medium (MEM) and put in contact with fibroblastic cell culture. The cellular viability percentage was verified by neutral red uptake method and the results showed the cytotoxicity index $IC_{50\%}$ of 0.04 mol dm^{-3}, indicating that in concentrations above this, benzotriazole is cytotoxic.

Resumo

Existe muita controvérsia com relação à citotoxicidade do benzotriazol que é um conhecido inibidor de corrosão de cobre e suas ligas, e mais recentemente tem sido investigado para inibição da corrosão de aços inoxidáveis. Segundo a ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ), o benzotriazol (BTAH) apresenta potencial tóxico, mas a concentração a partir da qual esta toxicidade é verificada, não é especificada. Considerando-se a preocupação com o meio ambiente e a conhecida efetividade deste composto para inibição da corrosão de vários materiais metálicos, foi realizado o teste de citotoxicidade utilizando-se concentrações deste composto na faixa entre 10^{-1} mol dm^{-3} e 10^{-5} mol dm^{-3}. O benzotriazol foi devidamente diluído em meio de cultura (MEM) e colocado em contato com cultura de células fibroblásticas. A porcentagem de viabilidade celular foi verificada pelo método de incorporação do vermelho neutro e os resultados obtidos forneceram o índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$ de 0,04 mol dm^{-3} indicando que em concentrações acima desta, o benzotriazol é citotóxico.

Palavras-chave: Inibidor de corrosão, benzotriazol, citotoxicidade.

[1] Mestre, Farmacêutica - Pesquisadora do IPEN/CNEN-SP.
[2] Doutorando, Químico – IPEN/CNEN-SP
[3] Doutora, Engenheira Química - Pesquisadora do IPEN/CNEN-SP

Introdução

Inibidores de corrosão são substâncias que, quando presentes em concentrações adequadas no meio corrosivo, reduzem ou eliminam a corrosão reagindo quimicamente com o metal ou se adsorvendo as superfícies metálicas [1]. Quando reagem com o substrato metálico são capazes de formar, na maioria das vezes, uma película protetora sobre a superfície metálica. Esta promove uma barreira contra a corrosão do substrato metálico de interesse.

O benzotriazol (BTAH) (Figura 1) é um inibidor de corrosão muito conhecido e eficiente para a proteção do cobre e suas ligas [1-7]. Apesar de muito empregado como inibidor do cobre e suas ligas, o benzotriazol tem sido muito utilizado para a proteção de aços inoxidáveis [8,9], aço carbono [10-13], alumínio [14] e ferro [15].

Figura 1

Existe muita controvérsia com relação à citotoxicidade do benzotriazol. Segundo a ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) o benzotriazol apresenta potencial tóxico, mas a concentração a partir da qual esta toxicidade é verificada, não é especificada**.** Os dados de toxicidade são de testes em animais, por inalação, contato e ingestão por via oral, ensaios *in vivo*. Portanto o objetivo deste trabalho foi verificar o nível de toxicidade do benzotriazol no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro. Considerando-se a preocupação com o meio ambiente, é importante a realização do teste de toxicidade em animais aquáticos e condições ambientais da região.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a concentração a partir da qual a toxicidade do benzotriazol é verificada, o que foi realizado por meio do teste de citotoxicidade utilizando-se concentrações deste composto na faixa entre 10^{-1} mol dm^{-3} e 10^{-5} mol dm^{-3}.

Metodologia

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com solução estoque de benzotriazol diluído em solução tampão de fosfato salina (PBS) pH 7,4 na concentração de 10^{-1} mol dm^{-3}. A metodologia utilizada foi a da incorporação do vermelho neutro, baseado em normas internacionais e procedimento descrito em trabalho anterior [17,18]. Foi utilizada uma solução de fenol 0,02% como controle positivo e, como controle negativo, PVC atóxico.
Primeiramente, foram feitas diluições da solução estoque nas concentrações de 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} e 10^{-5} mol dm^{-3} em meio de cultura celular (MEM). O ensaio foi realizado colocando-se estas soluções em contato com cultura de células de tecido conectivo de camundongo da linhagem NCTC L929 da American Type Culture Collection (ATCC), em microplaca de 96 poços. A microplaca foi deixada em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% CO_2 durante 24h. Após este período, as soluções foram substituídas pelo meio de cultura MEM contendo vermelho neutro, e a microplaca foi deixada por mais 3h em estufa. Decorrido este tempo, necessário para a incorporação e fixação do vermelho neutro nas células íntegras, o meio foi descartado e a microplaca lavada com tampão PBS. As células foram então rompidas para liberação do vermelho neutro incorporado pelas células vivas com solução de ácido acético e etanol e a densidade óptica dos poços da microplaca lida em espectrofotômetro leitor de ELISA, em 540nm. A partir das leituras de DO foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular tendo como padrão 100% um controle de células na mesma microplaca.

Neste primeiro ensaio foi verificado que o índice de citotoxicidade do benzotriazol estava entre a concentração de 10^{-2} e 10^{-3} mol dm^{-3}. Portanto, foi repetido o ensaio utilizando-se as concentrações de $5x10^{-2}$ e $5x10^{-3}$ mol dm^{-3}, diluídos em série com o meio de cultura MEM e a metodologia utilizada foi a mesma.

Resultados e Discussão

Utilizando as leituras de DO obtidas no ensaio foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular, apresentadas na Tabela 1. Projetando-se os valores de % viabilidade das células em função da concentração do benzotriazol foi obtida a curva de viabilidade celular (Figura 2) e através desta curva é possível verificar o índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$) do composto na intersecção da curva de viabilidade e a linha de 50% de morte celular. O $IC_{50\%}$ significa a concentração do benzotriazol que provoca a morte de 50% da população celular utilizada no ensaio. Isto significa que as concentrações que estão acima da linha do $IC_{50\%}$ não apresentam toxicidade e as que se encontram abaixo do $IC_{50\%}$ são consideradas tóxicas.

Tabela 1

Figura 2

Através deste ensaio foi verificado que o índice de citotoxicidade do benzotriazol está entre a concentração de 10^{-2} e 10^{-3} mol dm^{-3}. Portanto, foi repetido o ensaio utilizando-se as concentrações de $5x10^{-2}$ e $5x10^{-3}$ mol dm^{-3}, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2 e as curvas de viabilidade celular na Figura 3.

Tabela 2

Figura 3

No gráfico da Figura 3 pode ser observado que o benzotriazol na concentração de $5x10^{-3}$ mol dm^{-3} não apresentou toxicidade, assim como o controle negativo. O benzotriazol na concentração de $5x10^{-2}$ mol dm^{-3} apresentou toxicidade e foi obtido o $IC_{50\%}$ de 81, sendo que o do controle positivo foi de 41. Isto significa que o benzotriazol $5x10^{-2}$ mol dm^{-3}, na diluição de 81% lesou 50% da população celular deste ensaio, ou seja, o $IC_{50\%}$ do benzotriazol é cerca de $4x10^{-2}$ mol dm^{-3}.

Os resultados, portanto mostram que para concentrações abaixo de $4x10^{-2}$ mol dm^{-3} o benzotriazol não apresenta problemas relativos à citotoxicidade, mas deve-se cuidar para que esta concentração não seja excedida no descarte destes produtos. Tal resultado gera certa preocupação, pois a concentração de BTAH geralmente empregada para inibição da corrosão encontra-se entre 10^{-2} a 10^{-4} mol dm^{-3} [5,7,13,18,19].

Ainda com relação à preocupação com o meio ambiente vale ressaltar que a ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) para o benzotriazol alerta sobre efeitos ecotóxicos deste da seguinte forma: *"Pode causar efeitos negativos em longo prazo no ambiente aquático"*. Com base neste alerta, seria interessante a realização do teste de toxicidade em Daphnia utilizando-se os organismos e condições de ambiente da nossa região para comprovar o dado contido na FISPQ.

Conclusões

1. No ensaio *in vitro* de citotoxicidade foi verificado que o $IC_{50\%}$ do benzotriazol foi de 0,04 mol dm^{-3}, o que significa que em concentrações acima deste valor o benzotriazol é tóxico.
2. Estudos devem ser continuados no sentido de verificar o efeito ecotoxicológico do benzotriazol nas condições ambientais brasileiras para regulamentar o descarte das soluções utilizadas no tratamento das ligas metálicas.

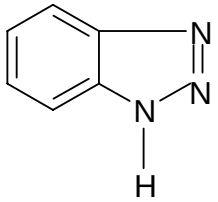

Figura 1. Estrutura do benzotriazol.

Tabela 1. Resultados da porcentagem de viabilidade celular de diferentes concentrações de Benzotriazol no ensaio preliminar de citotoxicidade.

Concentração Benzotriazol (mol dm^{-3})	Viabilidade celular (%) ± cv
10^{-2}	0 ± 0
10^{-3}	73 ± 13
10^{-4}	77 ± 17
10^{-5}	106 ± 9

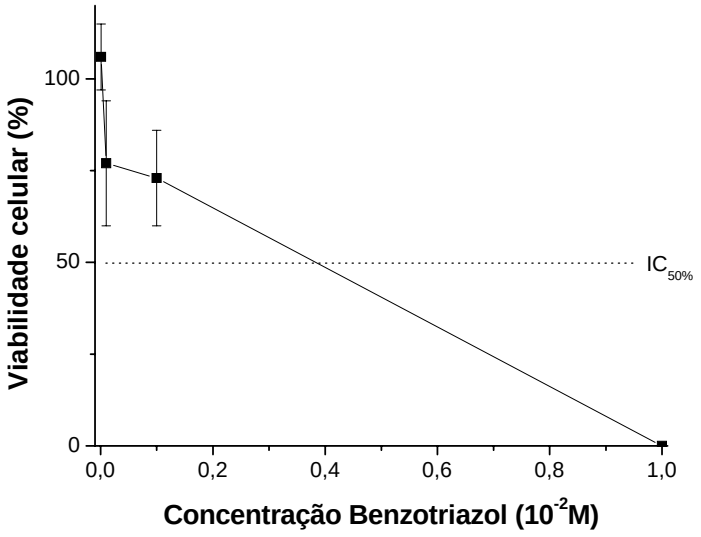

Figura 2. Curva de viabilidade celular do benzotriazol obtida no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro

Tabela 2. Resultados da porcentagem de viabilidade celular de diferentes concentrações de benzotriazol no ensaio de citotoxicidade.

Concentração Extrato (%)	Viabilidade celular (%) ± cv			
	Controle negativo	Controle positivo	$5x10^{-2}$ mol dm^{-3}	$5x10^{-3}$ mol dm^{-3}
100	101 ± 18	0 ± 0	34 ± 16	95 ± 15
50	93 ± 8	36 ± 18	73 ± 20	109 ± 13
25	96 ± 15	74 ± 10	83 ± 18	106 ± 11
12,5	75 ± 19	83 ± 13	68 ± 14	100 ± 9
6,25	86 ± 5	91 ± 11	92 ± 12	84 ± 8

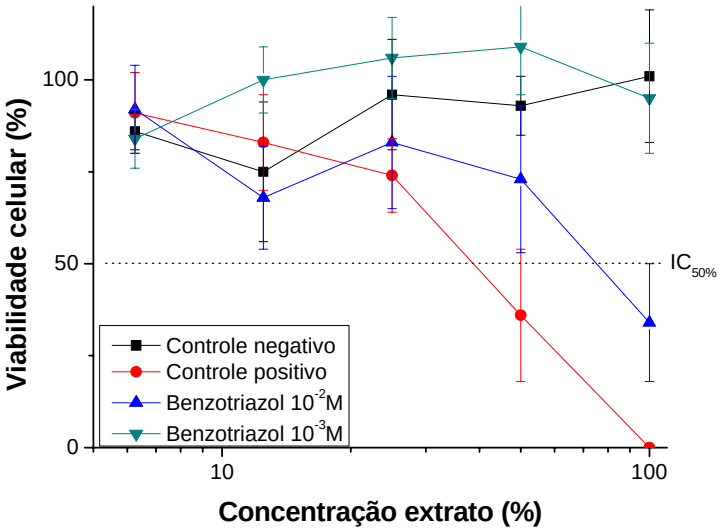

Figura 3. Curvas de viabilidade celular do benzotriazol no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa fornecida para E. P. Banczek e à Rezolina Pereira dos Santos do Instituto Adolfo Lutz pela preparação das placas de cultura celular.

Referências bibliográficas

[1] ALLAM, N.K.; ASHOUR, E.A.; HEGAZY, H.S.; EL-ANADOULI, B.E.; ATEYA, B.G. Effects of benzotriazole on the corrosion of Cu10Ni alloy in sulfide-polluted salt water. **Corrosion Science**, v. 47. pp. 2280–2292, 2005.

[2] ANTONIJEVIĆ, M.M.; MILIĆ, S.M.; ŠERBULA, S.M., BOGDANOVIĆ, G.D. The influence of chloride ions and benzotriazole on the corrosion behavior of Cu37Zn brass in alkaline médium. **Electrochimica Acta.** v. 50, pp. 3693–3701, 2005.

[3] RAVICHANDRAN, R.; NANJUNDAN, S.; RAJENDRAN, N. Effect of benzotriazole derivatives on the corrosion and dezincification of brass in neutral chloride solution. **Journal of Applied Electrochemistry** v.34, pp. 1171–1176, 2004.

[4].; CORDEIRO, G.G.O.; MATOS, J.; D'ELIA, E.; AGOSTINHO, S.M.L. Effect of sodium dodecylsulfate and benzotriazole on the interfacial behavior of Cu/Cu(II), H_2SO_4. **Materials Chemistry and Physics,** v. 78. pp. 448–452, 2002.

[5] VILLAMIL, R.F.V; CORIO, P.; RUBIM, J.C.; AGOSTINHO, S.M.L Sodium dodecylsulfate_ benzotriazole synergistic effect as an inhibitor of processes on copper chloridric acid interfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry** v.535, pp.75-83, 2002.

[6] VILLAMIL, R.F.V; CORIO, P.; RUBIM, J.C.; AGOSTINHO, S.M.L, Effect of sodium dodecylsulfate on copper corrosion in sulfuric acid media in the absence and presence of benzotriazole. **Journal of Electroanalytical Chemistry,** v. 472, pp.112-119, 1999.

[7] ABOUBAKR M. A., Faiza M. Al-Kharafi, Badr G. Ateya, Intergranular corrosion of copper in the presence of benzotriazole. **Scripta Materialia.** v. 54, pp.1673–1677, 2006
.
[8] A. Bellaouchou, B. Kabkab, A. Guenbour, A. B. Bachir Corrosion inhibition under heat transfer of 904L stainless steel in phosphoric acid by benzotriazole. **Progress in Organic Coatings**. v. 41, pp.121–127, 2001.

[9] NIU, L., CAO, C.N., LIN, H.C., SONG. G.L., Inhibitive effect of benzotriazole on the stress corrosion cracking of 07Cr8NiTi stainless steel in acidic chloride solution. **Corrosion Science** v. 39, n. 6. pp. 1109-1117. 1998.

[10] GOMMA, G.K., Influence of copper cation on inhibition of corrosion for steel in presence of benzotriazole in sulfuric acid. **Materials Chemistry and Physics** v.55, pp.131-138, 1998.

[11] S. T. Selvi, V. Raman, N. Rajendran Corrosion inhibition of mild steel by benzotriazole derivatives in acidic médium. **Journal of Applied Electrochemistry**, v.33, pp. 1175–1182, 2003.
.
[12] S. Tamilselvi, S. Rajeswari The effect of triazoles and surfactants on the corrosion inhibition of carbon steel in acid solution. **Anti-Corrosion Methods and Materials**. v.3. pp. 223–231. 2003.

[13] POPOVA. A., Temperature effect on mild steel corrosion in acid media in presence of azoles. **Corrosion Science** 49 2144–2148. 2007.

[14] ZHELUDKEVICH, M.L., YASAKAU, K.A., POZNYAK, S.K., FERREIRA. M.G.S. Triazole and thiazole derivatives as corrosion inhibitors for AA2024 aluminium alloy. **Corrosion Science**. v. 47, pp. 3368–3383. 2005.

[15] YAO. J.L., REN. B., HUANG. Z.F., CAO. P.G., GU. R.A., TIAN Z. Q. Extending surface Raman spectroscopy to transition metals for practical applications IV. A study on corrosion inhibition of benzotriazole on bare Fe electrodes. **Electrochimica Acta,** v.48, pp. 1263-1271. 2003.

[16] International standard: Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.

[17] ROGERO, S.O., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., CRUZ, A.S., Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, **Materials Research,** v. 6, n. 3, pp. 317-320, 2003.

[18] COSTA, S.L.F.A., RUBIM, J.C.S., AGOSTINHO, M.L., Spectroelectrochemical study of the corrosion of a copper electrode in deaerated 1.0 M HCl solutions containing Fe(III)-Effect of the corrosion inhibitor benzotriazole. **J. Electroanal. Chem.** v.220, pp. 259-268, 1987.

[19] S. MAMAS, T. KLYAK, M. KABASAKALOĞLU, A.KOÇ. Effect of benzotriazole on brass corrosion. **Materials Chemistry and Physiscs** v. 93, pp. 41-47, 2005.